

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz

Untersuchungen zum Einfluss von Fettsäureamidohydrolase-Hemmstoffen auf die Migration und Differenzierung humaner Stammzellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Yvonne Wollank, geb. am 09.11.1985 in Frankfurt (Oder)

aus Berlin

Berlin, den 20.12.2018

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz,

Universitätsmedizin Rostock, Institut für Toxikologie und Pharmakologie,

PD Dr. med. Bertold Renner,

Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Medizinische Fakultät

PD Dr. rer. nat. Kirsten Peters,

Universitätsmedizin Rostock, Arbeitsbereich Zellbiologie

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2019

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Cannabinoide	1
1.2	Das Endocannabinoidsystem.....	1
1.3	Aufnahme und Freisetzung von Endocannabinoiden	3
1.3.1	NAEs	3
1.3.2	2-AG.....	4
1.4	Endocannabinoidrezeptoren	5
1.4.1	Klassische Cannabinoidrezeptoren	5
1.4.2	Ionenkanäle	7
1.4.3	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren.....	7
1.5	Liganden der Endocannabinoidrezeptoren	9
1.5.1	Agonisten.....	9
1.5.2	Antagonisten	9
1.6	Abbau von Endocannabinoiden	10
1.6.1	Abbau von NAEs.....	10
1.6.2	Abbau von 2-AG	12
1.7	Endocannabinoide und Stammzellen	12
2	ZIELSTELLUNG.....	15
3	MATERIALIEN UND METHODEN.....	17
3.1	Geräte	17
3.2	Verbrauchsmaterial	17
3.3	EDV-Programme.....	18
3.4	Methoden.....	19
3.4.1	Zellbiologische Methoden	19
3.4.1.1	Stammzellisolierung	19
3.4.1.2	Immunomagnetische Zellseparation von CD34 ⁺ -Zellen.....	20
3.4.1.3	Kultivierung von ADSCs	21
3.4.1.4	Passagieren von Zellen	22
3.4.1.5	Auftauen von Zellen	23
3.4.1.6	Zellzahlbestimmung	24
3.4.1.7	Osteogene Differenzierung	24
3.4.1.8	MTS-Färbung.....	25
3.4.1.9	Kristallviolett-Färbung	26
3.4.1.10	Alkalische-Phosphatase-Färbung	27

3.4.1.11	Kresolphthalein-Färbung (Kreso-Färbung)	28
3.4.1.12	Migrationsassay	29
3.4.1.13	WST-1-Test.....	30
3.4.1.14	Scratch-Assay	31
3.4.1.15	Vorbereitung LC-MS	32
3.4.1.16	LC-MS.....	32
3.4.1.17	Mikroskopie mit Axio Scope A.1	34
3.4.2	Proteinchemische Methoden	35
3.4.2.1	Ernte von Zelllysaten mit Kralowski-Puffer	35
3.4.2.2	Proteinbestimmung mit BCA-Kit.....	37
3.4.2.3	Probenvorbereitung SDS-Gelelektrophorese	38
3.4.2.4	Gießen der SDS-Gele	38
3.4.2.5	SDS-Gelelektrophorese	40
3.4.2.6	Western Blot	41
3.4.2.7	Auswertung der Membranen mittels ChemiDoc.....	42
3.4.2.8	Statistik.....	44
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Kultivierung von ADSCs.....	45
4.2	Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Migration von ADSCs....	46
4.2.1	Scratch-Assay.....	46
4.2.2	Kinetik der promigratorischen Wirkung im Boyden-Kammer-Versuch.....	47
4.2.3	Konzentrationsabhängigkeit der promigratorischen Wirkung im Boyden-Kammer-Versuch.....	48
4.3	Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Viabilität von ADSCs.....	49
4.4	Rolle der p42/44 MAPK bei der promigratorischen Wirkung von FAAH-Inhibitoren	50
4.5	Kinetik der MAPK-Aktivierung durch FAAH-Inhibitoren	50
4.5.1	Konzentrationsabhängigkeit der MAPK-Aktivierung durch FAAH-Inhibitoren	52
4.5.2	Einfluss der p42/44-MAPK-Aktivierungshemmung auf die promigratorische Wirkung von FAAH-Inhibitoren	53
4.6	Rolle von CB₁, CB₂ und TRPV1 bei der FAAH-Inhibitor-bedingten Migration.....	54
4.7	Nachweis der Effizienz der FAAH-Inhibitoren mittels LC-MS.....	55
4.8	Promigratorischer Effekt von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen	56
4.8.1	Scratch-Assay.....	57

4.8.2 Konzentrationsabhängigkeit der promigratorischen Wirkung im Boyden-Kammer-Versuch.....	57
4.9 Einfluss von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen auf die Viabilität von ADSCs.....	61
4.9.1 Konzentrationsabhängigkeit der MAPK-Aktivierung durch Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen	61
4.10 Rolle von CB₁, CB₂ und TRPV1 bei der Endocannabinoid-bedingten Migration	64
4.11 Rolle von PPARα bei der promigrativen Wirkung von FAAH-Hemmern und FAAH-Substraten	64
4.11.1 Rolle von PPAR α bei der FAAH-Hemmer-bedingten Migration.....	64
4.11.2 Rolle von PPAR α bei der promigrativen Wirkung von Endocannabinoiden bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen	65
4.11.3 Wirkung des PPAR α -Agonisten WY14643 auf die Migration von ADSCs	67
4.12 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur PPARα-Aktivierung.....	68
4.12.1 FAAH-Inhibitoren	68
4.12.2 Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen.....	71
4.12.3 Einfluss von PD98059, GW6471 und WY14643 auf die PPAR α -Aktivierung	74
4.12.4 Einfluss von GW6471 auf die FAAH-Hemmer-induzierte p42/44-MAPK-Aktivierung ...	75
4.13 Einfluss von FAAH-Hemmern auf die osteogene Differenzierung von ADSCs	78
5 DISKUSSION	81
6 ZUSAMMENFASSUNG	89
7 SUMMARY	90
8 QUELLEN.....	91
9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	105

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche in der Arbeit verwendeten fremden Quellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 20.12.2018

Yvonne Wollank

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Burkhard Hinz und PD Dr. Kirsten Peters für die Themenvergabe und die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am Institut für Toxikologie und Pharmakologie, in Zusammenarbeit mit dem Arbeitsbereich Zellbiologie, anfertigen zu können.

Besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Burkhard Hinz für die exzellente wissenschaftliche Betreuung bezüglich der Planung und Durchführung der Experimente.

Weiterhin danke ich Stefanie Adam, Philipp Borchert und Dr. Robert Ramer für ihre umfassenden Hilfestellungen im Labor und die Unterstützung bei diversen großen und kleinen Problemen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Igor Ivanov für die Durchführung der LC-MS Analysen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre danken.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie dafür, dass sie mich stets motiviert und unterstützt hat.

Abkürzungsverzeichnis

2-AG: 2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethylester-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure; 2-Arachidonylglycerol
2-AGE: 2-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14- Icosatetraen-1-yloxy]-1,3-propanediol; 2-Arachidonylglycerylether
ABHD6/12: Abhydrolase Domän-beinhaltendes Protein 6/12
ACEA: N-(2-Chloroethyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamid; Arachidonyl-2'-chloroethylamid; Cannabinoidrezeptor-Agonist
ACPA: N-(Cyclopropyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamid; Arachidonylcyclopropylamid; Cannabinoidrezeptor-Agonist
AA-5HT: N-[2-(5-Hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl]-5,8,11,14-eicosatetraenamid; Arachidonylserotonin
ADSCs: mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (adipose-derived stem cells)
AEA: N-(2-hydroxyethyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamide; Anandamid; Arachidonylethanolamid
AK: Antikörper
ALP: alkalische Phosphatase
AM-251: N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamid; CB₁-Antagonist
AM-281: 1-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-4-morpholinyl-1H-pyrazole-3-carboxamid; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
AM-404: (5Z,8Z,11Z,14Z)- N-(4-Hydroxyphenyl)icosa- 5,8,11,14-tetraenamid; N-arachidonoylaminophenol; inhibiert 2-AG-Aufnahme
AM-630: (6-Iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl) ethyl]-1H-indol-3-yl)(4-methoxyphenyl) methanon; CB₂-Antagonist
AMT: Anandamid-Membrantransporter
AS Enzym: Amidase-Signatur-Enzym
ATP: Adenosintriphosphat
BCA: Bicinchoninsäure
BSA: Rinderserumalbumin
Capsa: Capsazepin; TRPV1-Antagonist
CB_{1/2/3}: Cannabinoidrezeptor 1/2/3
CBD: Cannabidiol, 2-[(1S,6S)-3-Methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-2-enyl]-5-pentylbenzene-1,3-diol
CFU-GEMM: Kolonie-bildende Einheit, die myeloide Zellen generiert
CP55940: 2-[(1R,2R,5R)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl)cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol; synthetisches Cannabinoid
DAGL: Diacylglycerollipase
DMSO: Dimethylsulfoxid
DNA: Desoxyribonukleinsäure
ECL: verstärkte (enhanced) Chemolumineszenz
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EMT: Endocannabinoid-Membrantransporter
ERK1/2: p42/44 MAPK
FAAH/FAAH-I: Fettsäureamidohydrolase, NAE- und 2-AG-abbauendes Enzym
FAAH-2: alternative Splicevariante der FAAH
FKS: fötales Kälberserum
FLAT: FAAH-artiger Anandamid-Transporter
GPCRs: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRP55: G-Protein-gekoppelter Rezeptor 55
GW6471: N-((2S)-2-(((1Z)-1-Methyl-3-oxo-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)prop-1-enyl)amino)-3-(4-(2-(5-methyl-2-phenyl-1,3-oxazol-4-yl)ethoxy)phenyl)propyl)propanamid; PPAR α -Antagonist
HU-210: (6aR,10aR)-9-(Hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-3-(2-methyloctan-2-yl)-6a,7,10,10a-tetrahydrobenzo [c]chromen-1-ol; synthetisches Cannabinoid
HU-308: [(1R,2R,5R)-2-[2,6-dimethoxy-4-(2-methyloctan-2-yl)phenyl]-7,7-dimethyl-4-bicyclo[3.1.1]hept-3-enyl] methanol; Cannabinoidrezeptor-Agonist
JTE-907: N-(benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-7-methoxy-2-oxo-8-pentyloxy-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamid; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
JWH-015: (2-Methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanon; Cannabinoidrezeptor-Agonist
JWH-139: 3-(1,1-Dimethylpropyl)-6,6,9-trimethyl-6a,7,10,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chrom; Cannabinoidrezeptor-Agonist
KV: N-Hexamethylpararosanilin, Kristallviolett
Kreso: Kresolphthalein
L-759633: (6aR,10aR)-1-methoxy-6,6,9-trimethyl-3-(2-methyloctan-2-yl)-6a,7,10,10a-tetrahydrobenzo[c]chrom; Cannabinoidrezeptor-Agonist
LC-MS: Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LY320135: 4-[6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-1-benzofuran-3-carbonyl]benzonitril; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
MACS: magnetisch-aktivierte Zellsortierung
MAGL: Monoacylglycerollipase; 2-AG-abbauendes Enzym
MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA: Boten-RNA
MSCs: mesenchymale Stammzellen
MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazol
NAAA: N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase; NAE-abbauendes Enzym
NADA: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl]eicosa-5,8,11,14-tetraenamid; N-Arachidonyldopamin
NAEs: N-Acylethanolamide
NAPE-PLD: NAPE-spezifische Phospholipase D
NMDA: N-Methyl-D-aspartat
O-1812: (5Z,8Z,11Z,14Z)-20-cyano-N-[(2R)-1-hydroxypropan-2-yl]-16,16-dimethyl-eicosa-5,8,11,14-tetraenamide; Cannabinoidrezeptor-Agonist

O-2654: 6''-azidohex-2''-yne-cannabidiol; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
OAE: o-Arachidonylethanolamin; Virodhamin
OD: optische Dichte
OEA: (Z)-N-(2-Hydroxyethyl)octadec-9-enamid; Oleoylethanolamid
OS: Osteogenese-Stimulanz
PBS: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD98059: 2'-Amino-3'-methoxyflavon; p42/44-MAPK-Aktivierungs-Inhibitor
PEA: N-(2-Hydroxyethyl)hexadecanamid; Palmitoylethanolamid
PFA: Paraformaldehyd
PMSF: Phenylmethansulfonylfluorid
pNpp: Para-Nitrophenylphosphat
PPARs: Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
R-(+)-WIN55212: (R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanon; Cannabinoidrezeptor-Agonist
SB203580: 4-(4'-Fluorophenyl)-2-(4'-methylsulfinylphenyl)-5-(4'-pyridyl)-imidazol; p38-Inhibitor
Sch336: N-[1(S)-[4-[[4-methoxy-2-[(4-methoxyphenyl)sulfonyl]phenyl]-sulfonyl]phenyl] ethyl]methanesulfonamid; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
SDS: Natriumdodecylsulfat
SEM: Standardfehler des Mittelwertes
siRNA: kleine eingreifende (interferierende) RNA
SRI141716: 5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-dichloro-phenyl)-4-methyl-N-(piperidin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamid; Rimonabant; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
SRI47778: 5-(4-bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide; Surinabant; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
SRI44528: 5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-[(4-methylphenyl) methyl]-N-[(1S,2S,4R)-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-1H-pyrazole-3-carboxamid; Cannabinoidrezeptor-Antagonist
TBS: Trispuffersalzlösung
TEMED: Tetramethylethylendiamin
THC: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TMs: Transmembranregionen
Triton® X-100: Polyethylenglycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenylether
TRP: engl. *transient receptor potential*
TRPC: TRP-Kanal der klassischen Unterfamilie
TRPV: TRP-Kanal der Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie
TRPM: TRP-Kanal der Melastatin-Unterfamilie
TRPN: TRP-Kanal der NOMPC-Unterfamilie
TRPA: TRP-Kanal der ANKTM1-Unterfamilie
TRPML: TRP-Kanal der Mucolipin-Unterfamilie
TRPP: TRP-Kanal der Polycystin-Unterfamilie
URB597: [3-(3-Carbamoylphenyl)phenyl] N-cyclohexylcarbamate; FAAH-Inhibitor

VDM11: (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-Hydroxy-2-methylphenyl)-5,8,11,14-eicosatetraenamid, inhibiert Cannabinoidaufnahme

WST-1: 4-[-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,6-benzenedisulfonat

WY-14643: 4-Chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio-Essigssäure; PPAR α -Agonis

1 Einleitung

1.1 Cannabinoide

Cannabis sativa zählt zu den ältesten medizinisch, religiös und zur Entspannung genutzten Pflanzen. Ihre Verwendung kann bis zu 5000 Jahre zurückverfolgt werden (Mechoulam, 1986). Der mechanistische Hintergrund des Effektes von *Cannabis sativa* blieb jedoch, trotz der Entdeckung von Tetrahydrocannabinol (THC) (Gaoni und Mechoulam, 1964) und weiterer Cannabinoide, bis Ende der 1980er Jahre ungeklärt. Unter dem Begriff „Cannabinoide“ wurden ursprünglich die bekannten in *Cannabis sativa* natürlich vorkommenden aromatischen Hydrocarbon-Verbindungen (C₂₁) zusammengefasst (Mechoulam und Gaoni, 1967; ElSohy, 2002). Mittlerweile werden unter diesem Begriff alle natürlich vorkommenden und synthetischen Verbindungen zusammengefasst, die den Effekt von pflanzlichen Cannabinoiden zeigen oder strukturell verwandt sind. Um zu verdeutlichen, dass ausschließlich Cannabinoide aus *Cannabis sativa* gemeint sind, wird der Begriff Phytocannabinoide verwendet (Pate, 1999). Es wurden über 100 Phytocannabinoide identifiziert (Brenneisen, 2007; Mehmedic et al., 2010). Lange Zeit fokussierte man sich bei der Cannabinoidforschung auf THC als hauptsächlich rauschbewirkenden Bestandteil der Hanfpflanze (Pertwee, 1988). Dies änderte sich Ende der 1980er Jahre schlagartig durch die Entdeckung der Cannabinoidrezeptoren (Devane et al., 1988; Munro et al., 1993) und der ersten Endocannabinoide (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) in tierischem Gewebe.

1.2 Das Endocannabinoidsystem

Seit der erstmaligen Identifizierung von Anandamid (Arachidonylethanolamid, AEA) im Schweinehirn im Jahre 1992 (Devane et al., 1992) wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die dazu beitrugen, das Endocannabinoidsystem zu charakterisieren. Das endogene Cannabinoidsystem (bzw. Endocannabinoidsystem) ist ein komplexes Netzwerk von Rezeptoren, verschiedenen Liganden und einer Reihe von Enzymen, verantwortlich für die Synthese und den Abbau der Komponenten des Endocannabinoidsystems (Abb. 1). Es ist bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen involviert, wie Neurotransmission, Schmerzwahrnehmung, Motorik oder Immunantwort (Klein et al., 2000; Grant und Cahn,

2005; Di Marzo, 2008). Die am häufigsten untersuchten Endocannabinoide sind AEA (Okomoto et al., 2007) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) (Sugiura et al., 2006). Darüber hinaus zählen Noladin Ether (2-Arachidonylglycerylether, 2-AGE), Virodhamin (o-Arachidonylethanolamin, OAE), N-Arachidonyldopamin (NADA) und weitere verwandte Verbindungen wie Palmitoylethanolamid (PEA) und Oleoylethanolamid (OEA) (auch Endocannabinoid-ähnliche Substanzen genannt) zur Endocannabinoid-Familie (Bisogno et al., 2000; Hanus et al., 2001; Porter et al., 2002; Battista et al., 2012). Anders als AEA und 2-AG binden OEA und PEA nicht an CB₁ und CB₂. Sie sind jedoch in der Lage, TRPV1 und Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) zu aktivieren (Abb. 1, gestrichelter Pfeil) (Kozak et al., 2002; Ahern, 2003; Wisnoskey et al., 2003; Guzmán et al., 2004; Lo Verme et al., 2005; Ambrosino et al., 2013; Zygmunt et al., 2013).

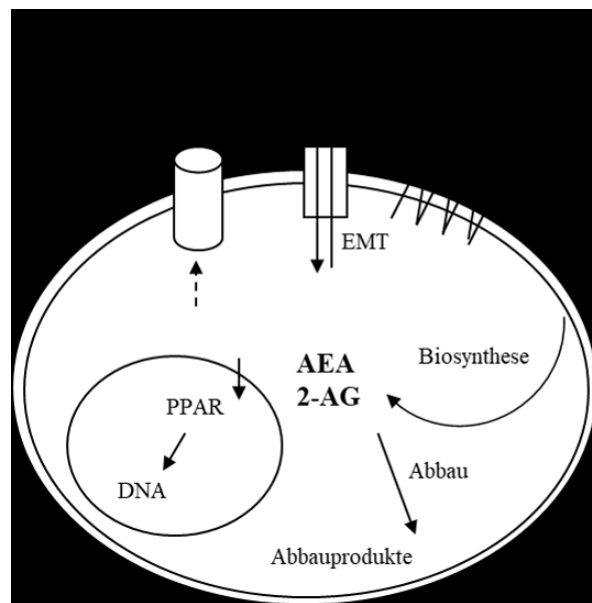


Abb. 1 Schematische Darstellung des Endocannabinoidsystems. Endocannabinoide werden, enzymatisch gesteuert, bei Bedarf als Antwort auf ein erhöhtes Level intrazellulären Kalziums produziert (Pandey et al., 2009). Anandamid (AEA) wird via N-Acyl-Phosphatidylethanolamin-spezifischer Phospholipase D (NAPE-PLD) synthetisiert und durch die Fettsäureamidohydrolase (FAAH) abgebaut. 2-AG wird aus Membranlipiden mittels DAGL (Diacylglycerollipase) gebildet und ebenfalls durch FAAH, aber auch durch MAGL (Monoacylglycerollipase), abgebaut. Die Aufnahme der exogenen Endocannabinoide erfolgt über einen postulierten Endocannabinoid-Membrantransporter (EMT). AEA und 2-AG aktivieren unterschiedliche Signalkaskaden, z. B. durch direkte Interaktion mit Cannabinoidrezeptoren (CBR; CB₁, CB₂, GPR55), Ionenkanälen (TRPV1) sowie nukleären Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs). AEA, aber nicht 2-AG, bindet auch intrazellulär an TRPV1 (Battista, 2012, gestrichelter Pfeil).

1.3 Aufnahme und Freisetzung von Endocannabinoiden

1.3.1 NAEs

Bereits kurz nach der Identifizierung von AEA als Vertreter der Gruppe der N-Acyl-Ethanolamine (NAEs, Abb. 2) gab es erste Studien zur Zellaufnahme dieses Endocannabinoids (Deutsch und Chin, 1993; Di Marzo et al., 1994). Di Marzo et al. (1994) zeigten, dass AEA aufgenommen wird und dass die Aufnahme zügig ($t = 2,5$ min) und temperaturabhängig abläuft, wobei es zu einer Sättigung kommt, was einen Transporter wahrscheinlich macht. Weitere Experimente belegen, dass der in beide Richtungen stattfindende Prozess des AEA-Transports weder ATP- noch Natrium-abhängig ist, was eine erleichterte Diffusion nahelegt (Hillard et al., 1997). Weiterhin wird die AEA-Aufnahme durch andere Arachidonyl-verbindungen, wie z. B. 2-AG, Arachidonsäure, Noladin Ether oder Virodhamin, aber nicht durch andere NAEs wie PEA oder Stearoylethanolamin inhibiert (Jarrahian et al., 2000; Jacobson und Fowler, 2001; Chicca et al., 2012). Die genaue Lokalisation des AEA-Membran-Transporters (AMT) wird von Di Marzo et al. (1994) nicht benannt. Ein AMT-Protein ist bisher nicht kloniert worden (Fowler, 2013) und seine Existenz wird kontrovers diskutiert. Es ist unklar, warum ein lipophiles Molekül wie AEA beim Transport durch die Plasmamembran die Hilfe eines Membran-Transporters benötigen sollte (Fowler, 2012). Weitere Studien haben darüber hinaus Daten geliefert, welche Di Marzos Resultate dahingehend relativieren, dass sie wahrscheinlicher das Ergebnis intrazellulärer Umverteilung sind, anstatt Transporter-bedingt (Glaser et al., 2003; Kaczocha et al., 2006; Thors und Fowler, 2006). Dafür würde auch die Arbeit von Di Pasquale sprechen. Diese zeigt, dass AEA auch proteinfreie Membranen überwinden kann (Di Pasquale et al., 2009). Mit dem momentanen Stand des Wissens kann ein AMT nicht bestätigt werden, was aber nicht bedeutet, dass dessen Existenz ausgeschlossen ist. Die einfachste Möglichkeit der Aufnahme von AEA wäre eine Assoziation mit Lipiden der Membran (Di Pasquale et al., 2009) und anschließende Translokation in die Zelle. Problematisch bei dieser Theorie ist, dass die Aufnahme aufhören würde, sobald extra- und intrazellulär ein Gleichgewicht erreicht wäre, sofern dieses nicht verhindert wird (Fowler, 2012). In diesem Zusammenhang rückte die AEA-abbauende Fettsäureamidohydrolase (FAAH) in den Fokus. FAAH-transfizierte

Zellen zeigten eine erhöhte AEA-Aufnahme, eine Inhibierung hatte den gegenteiligen Effekt (Day et al., 2001; Deutsch et al., 2001). Auf der anderen Seite konnte auch bei Synaptosomen und kultivierten Neuronen ohne FAAH eine AEA-Aufnahme nachgewiesen werden (Ligresti et al., 2004; Fegley et al., 2004; Ortega-Gurtiérrez et al., 2004; Fu et al., 2012). FAAH kann also nicht als alleiniger Aufnahmemechanismus dienen. Die FAAH-Theorie der AEA-Aufnahme kann man dahingehend verallgemeinern, dass die Aufnahmerate von AEA durch die intrazelluläre Konzentration dieses Endocannabinoids gesteuert wird. FAAH würde unter diese Theorie fallen, aber auch intrazelluläre Carrier-Proteine und intrazelluläre Einlagerung (Fowler et al., 2012). Infrage kommende Carrier-Proteine bzw. bindende Proteine wären z. B. FABP5, FABP7, Hsp70 und Albumin (Kaczocha et al., 2009; Oddi et al., 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass Endocannabinoide in Adiposomen eingelagert werden (Oddi et al., 2008; Kaczocha et al., 2010). Vor Kurzem wurde darüber hinaus eine katalytisch inaktive, AEA-bindende FAAH-Variante, genannt „FAAH-like anandamide transporter (FLAT)“, identifiziert (Fu et al., 2011). Eine genetische Deletion von FAAH in Mausneuronen, welche FAAH und FLAT eliminiert, führte jedoch nicht zu einer Aufhebung der AEA-Aufnahme (Fu et al., 2011). Genau wie die zelluläre Aufnahme ist die Freisetzung von AEA ein sehr schneller Prozess (Bojesen und Hansen, 2005), der viele Parallelen zur zellulären Akkumulation aufweist (Hillard et al., 1997) und durch VDM11 inhibiert werden kann (Ligresti et al., 2004).



Abb. 2 Strukturformeln von AEA, OEA und PEA als Vertreter der NAEs

1.3.2 2-AG

Erste Studien zur 2-AG-Aufnahme wurden 1998 durchgeführt (Di Marzo et al., 1998; Ben-Shabat et al., 1998). Im Vergleich zur NAE-Aufnahme ist relativ wenig über die 2-AG-Aufnahme bekannt. Man weiß jedoch, dass sich die NAE- und 2-AG-Aufnahme ähneln. So ist die Aufnahme von 2-AG temperaturabhängig und es kommt zu einer Sättigung. AM-404 inhibiert die Aufnahme (Beltramo und

Piomelli, 2000; Bisogno et al., 2001). Im Gegensatz zur NAE-Aufnahme scheint FLAT bei der 2-AG-Aufnahme keine Rolle zu spielen (Fu et al., 2012). Eine Inhibierung der 2-AG-Hydrolyse beeinflusst die Aufnahmerate nicht (Beltramo et al., 2000; Fowler und Ghafouri, 2008). 1999 lieferte Piomelli et al. Hinweise für die Existenz eines Membrantransporters und schlussfolgerten, dass AEA und 2-AG (Abb. 3) durch denselben Transporter, EMT (Endocannabinoid-Membrantransporter), internalisiert werden (Piomelli et al., 1999).

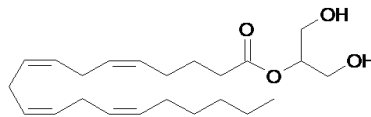


Abb. 3 Strukturformel von 2-AG.

1.4 Endocannabinoidrezeptoren

1.4.1 Klassische Cannabinoidrezeptoren

Ende der 1980er Jahre gab es viele Hinweise dafür, dass Cannabinoide in der Lage sind, auf zellulärer Ebene Veränderungen durch spezifische Rezeptorinteraktionen zu verursachen (Howlett, 1995). 1988 identifizierten Devane und Kollegen den ersten Cannabinoidrezeptor (CB₁) (Devane et al., 1988), woraufhin es Matsuda et al. 1990 gelang, diesen zu klonieren (Matsuda et al., 1990). Ein zweiter Cannabinoidrezeptor (CB₂) wurde 1993 kloniert (Munro et al., 1993). CB₁ und CB₂ gehören zur α -Gruppe der A-Klasse (Rhodopsin-artig) der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs; Pertwee et al., 2010), d. h. sie sind Pertussistoxin-sensitiv und eine Rezeptoraktivierung führt zur Inhibierung der Adenylatzyklase (Howlett et al., 2002). Beide Rezeptoren sind in der Lage, die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Signalkaskade zu aktivieren (Bouaboula et al., 1995, 1996). Die Inhibierung der Adenylatzyklase und die Aktivierung des MAPK-Signalweges erfolgt via G_{i/o}-Proteine (Howlett, 2005). Zusätzlich ist CB₁ in der Lage via G_s-Proteinen zu agieren, was zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase führt (Howlett, 2005). Auf phylogenetischer Ebene zählen sie zum selben Cluster wie Opsin-, Prostaglandin- und Lipidrezeptoren (Brown, 2007). Es besteht eine 48 %ige Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen CB₁ und CB₂ (Howlett et al., 2002). CB₁ wird besonders stark im Gehirn, konkret im Kortex, Hippocampus, Amygdala,

Basalganglien und Kleinhirn exprimiert. Primär wird CB₁ dabei von Axonen und Synapsenenden von Neuronen exprimiert (Mackie, 2005). Neben dem zentralen und peripheren Nervensystem wurde CB₁ auch in anderen Geweben nachgewiesen, wie z. B. Nebenniere, Thymus, Mandeln, Herz, Lunge, Uterus, Eierstock, Prostata und Hoden (Galiègue et al., 1995). Im Skelett wird CB₁ von Nervenfasern zwischen Knochen (Tam et al., 2006) und von Zellen des Immunsystems im Knochenmark (Klein et al., 2003) exprimiert. CB₁ konnte auf Protein- und mRNA-Ebene auf Osteoblasten, Osteoklasten und Adipozyten aus dem Knochenmark nachgewiesen werden (Idris et al., 2009; Rossi et al., 2009). *In vivo* liegt CB₁ höchstwahrscheinlich als Homomer vor (Wager-Miller et al., 2002). Darüber hinaus ist CB₁ in der Lage Heteromere zu bilden, wie z. B. mit Dopaminrezeptoren (Pertwee et al., 2010). CB₂ wird hauptsächlich in Organen des Immunsystems (z. B. Milz) und von Immunzellen exprimiert, wie z. B. B- und T-Zellen, Makrophagen oder natürlichen Killerzellen (Howlett et al., 2002). CB₂ wird auch von Neuronen exprimiert, aber nur in peripheren Bereichen und deutlich geringer als CB₁ (Gong et al., 2006). Weiterhin wird CB₂ von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten exprimiert – weit stärker als CB₁ (Ofek et al., 2006). Ein Zwei-Rezeptoren-System, basierend auf CB₁ und CB₂, ist nach heutigem Kenntnisstand nicht in der Lage, die Effekte von Cannabinoiden hinreichend zu erklären, wodurch nach weiteren Rezeptoren gesucht wurde. In den Fokus gerieten dabei diverse GPCRs, wie z. B. GPR55 (Pertwee et al., 2010). GPR55 wurde 1999 isoliert (Sawzdargo et al., 1999) und gehört zur δ -Gruppe der A-Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Fredriksson et al., 2003). Interessanterweise ist die Aminosäurehomologie zu CB₁ (13,5 %) und CB₂ (14,4 %) sehr gering (Pertwee et al., 2010). Da die Literatur hinsichtlich der pharmakologischen Wirkung auf und durch GPR55 im Rahmen des Cannabinoidsystems jedoch widersprüchliche Angaben macht, ist es bisher nicht möglich, GPR55 als CB₃ zu klassifizieren (Pertwee et al., 2010).

1.4.2 Ionenkanäle

Neben den bereits diskutierten Rezeptoren spielen auch Ionenkanäle für das Endocannabinoidsystem eine Rolle. TRP-Kanäle (engl. *transient receptor potential channels*) sind bei der Weiterleitung einer großen Bandbreite von Stimuli beteiligt, wie z. B. Temperatur, mechanischen und osmotischen Stimuli, elektrische Ladung, Licht, Geruch, Geschmack oder xenobiotische Substanzen (Venkatachalam und Montell, 2007). TRPV1 spielt eine Rolle bei der Schmerz- und Temperaturwahrnehmung (Caterina et al., 2000) und wird hauptsächlich von sensorischen Neuronen exprimiert (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998), aber auch in Nervenzellen des Gehirns und nicht-neuronalen Zellen, wie z. B. Epithel-, Endothel-, Glia-, glatten Muskel-, Mast- und dendritischen Zellen, Lymphozyten, Keratinozyten, Osteoklasten, Hepatozyten, Myotuben, Fibroblasten und pankreatischen β -Zellen (Starowicz et al., 2007). In Anbetracht der Kollokalisierung von TRPV1 und CB₁ bzw. CB₂ ergibt sich die Möglichkeit intrazellulärer Wechselwirkungen (Di Marzo und Cristino, 2008), was ein wichtiger Aspekt bezüglich der funktionellen Konsequenzen für eine Aktivierung durch Liganden affin für TRPV1 und CB₁ bzw. CB₂ darstellt (Hermann et al., 2003; Fioravanti et al., 2008). Es gibt über 300 experimentelle Arbeiten, die bestätigen, dass Endocannabinoide wie AEA und N-Arachidonyldopamin (NADA), nicht aber 2-AG, Noladin Ether oder Virodhamin an TRPV1 als Agonisten binden (Zygmunt et al., 1999, Starowicz et al., 2007). Aufgrund der experimentellen Daten kann man starke Argumente dafür liefern, TRPV1 als "ionotropen Cannabinoidrezeptor" zu klassifizieren, obwohl dieser Kanal deutlich weniger selektiv angesteuert wird als CB₁- bzw. CB₂-Rezeptoren (Pertwee et al., 2010).

1.4.3 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Endocannabinoidsystem mit nukleären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) interagiert, d. h. eine exogene Zugabe führt dazu, dass Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Verbindungen an PPARs binden und diese aktivieren (O'Sullivan, 2007). PPARs sind Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren zählen (Michalik et al., 2006). Es sind drei Isoformen von PPARs bekannt: PPAR α , PPAR δ/β und PPAR γ . PPAR α wurde

1990 durch Issemann und Green identifiziert (Issemann und Green, 1990), PPAR β/δ und PPAR γ 1992 durch die Arbeitsgruppe um Dreyer (Dreyer et al., 1992). PPAR β/δ wurde nach der Identifizierung in Amphibien PPAR β genannt, in der Maus aufgrund der geringen Homologie PPAR δ , da zunächst ein vierter PPAR-Isotyp postuliert wurde (Kliwer et al., 1994). Die Sequenzierung des Säuger-genoms zeigte jedoch, dass nur drei Isotypen existieren (Michalik et al., 2006). Der erste Nachweis zur Interaktion von PPARs und Cannabinoiden wurde 2002 erbracht, als gezeigt wurde, dass 2-AG mit PPAR α interagiert (Kozak et al., 2002). 2003 brachte die Arbeitsgruppe um Fu den ersten Beweis, dass OEA an PPAR α bindet und dessen transkriptionelle Aktivität erhöht (Fu et al., 2003). Die Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus zeigen, dass PPAR α -knockout-Mäuse den OEA-induzierten appetithemmenden und gewichtsreduzierenden Effekt nicht aufweisen (Fu et al., 2003). Es konnte weiterhin die Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von PPAR α durch PEA nachgewiesen werden (LoVerme et al., 2005). Andere an PPAR α bindende Cannabinoide sind AEA, Noladin Ether und Virodhamin (Sun et al., 2007). Auch PPAR γ ist Bindungspartner für Cannabinoide, wobei PPAR γ -Liganden sich durch die Stimulation der Adipogenese auszeichnen (Mueller et al., 2002). AEA bindet direkt an PPAR γ , erhöht dessen transkriptionelle Aktivität und stimuliert die adipogene Differenzierung (Bouaboula et al., 2005; Gasperi et al., 2007). 2-AG zeigt einen analogen Effekt (Boubaoula et al., 2005; Rockwell et al., 2006). Die transkriptionelle Aktivität wird darüber hinaus auch durch NADA erhöht (O'Sullivan et al., 2006). PPAR γ wird nicht von allen Endocannabinoiden aktiviert, so bindet PEA weder an PPAR γ (Boubaoula et al., 2005) noch erhöht es dessen transkriptionelle Aktivität (LoVerme et al., 2006). Auch OEA hat keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ (Fu et al., 2003). PPAR β ist der am wenigsten untersuchte Rezeptor und wird als metabolischer Regulator postuliert (Barish et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass OEA – anders als 2-AG oder PEA – die transkriptionelle Aktivität von PPAR β erhöht (Kozak et al., 2002; Fu et al., 2003; LoVerme et al., 2006).

1.5 Liganden der Endocannabinoidrezeptoren

1.5.1 Agonisten

Cannabinoidrezeptor-Agonisten kann man aus chemischer Sicht in vier verschiedene Gruppen einteilen: 1) klassische Cannabinoide, 2) nicht-klassische Cannabinoide, 3) Aminoalkylindole und 4) Eicosanoide.

Zur Gruppe der klassischen Cannabinoide zählen ABC-trizyklische Dibenzo-pyranerivate, welche natürlich in *Cannabis sativa* vorkommen oder synthetische Analoga dieser Verbindungen, z. B. Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, JWH-015, JWH-139, L-759633, HU-308 und HU-210. Nicht-klassische Cannabinoide sind synthetisch hergestellte Cannabinoide, die in ihrer Struktur den klassischen Cannabinoiden ähneln, z. B. CP55940. Agonisten des Aminoalkylindol-Typs waren eine zufällige Entdeckung Anfang der 1990er und weichen in ihrer Struktur stark von der typischen Cannabinoidstruktur ab. Das am besten untersuchte Beispiel ist R-(+)-WIN55212, ein Aminoalkylindolderivat. Eicosanoide umfassen die Endocannabinoide und strukturelle Analoga. Beispiele für diese Gruppe, neben den Endocannabinoiden, sind z. B. O-1812, Arachidonylcyclopropylamid (ACPA) und Arachidonyl-2-chloroethylamid (ACEA) (Howlett et al., 2002). Die CB₁-selektiven Agonisten zählen, aus chemischer Sicht, mit einigen Ausnahmen zu der Gruppe der Eicosanoide. CB₂-selektive Agonisten sowie die Gruppe der nicht-selektiven Agonisten (z. B. AEA bzw. 2-AG) tendieren zu einer größeren Heterogenität (Szabo, 2008). Vanilloide, insbesondere Capsaizin und Resiniferatoxin (RTX), sind die bekanntesten Agonisten von TRPV1. Capsaizin und RTX sind aufgrund von Nebenwirkungen für den therapeutischen Ansatz unattraktiv. Dies führte zur Entwicklung einer ganzen Reihe von Alternativen, wie z. B. SDZ-249482, Phenylacetylrinvanil, NGX-4010 oder DA-5018 (Messegueur et al., 2006). Darüber hinaus sind AEA und NADA TRPV1-Agonisten (Hwang et al., 2000; Zheng et al., 2003).

1.5.2 Antagonisten

Der erste CB₁-Antagonist, SR141716 (Rimonabant), stammt aus dem Labor von Sanofi Pharmaceutical und wurde 1994 entwickelt. Er bildete die Grundlage für viele weitere CB₁-Antagonisten (AM-251, AM-281, SR147778). Heutzutage gibt es darüber hinaus andere CB₁-Antagonisten, welche keine Strukturanalogie zu

Rimonabant aufweisen (z. B. LY320135). Bei vielen CB₁-Antagonisten handelt es sich um inverse Agonisten. Inverse Agonisten bringen das Problem mit sich, dass man nicht sagen kann, ob *in vivo* Effekte das Ergebnis der Endocannabinoid-Blockierung oder der Herabsetzung der Aktivität von CB₁ sind. Abhilfe schaffen "neutrale" CB₁-Antagonisten (z. B. O-2654). Der erste CB₂-Antagonist, SR144528, stammt ebenfalls aus dem Labor von Sanofi Pharmaceutical. Andere CB₂-Antagonisten sind z. B. AM-630, JTE-907 oder Sch336. CB₂-Antagonisten sind häufig inverse Agonisten (Szabo, 2008). Neben der Entwicklung von Antagonisten für CB₁ und CB₂ wurde intensiv an der Entwicklung von TRPV1-Antagonisten gearbeitet. Der erste kompetitive Antagonist, Capsazepin (Capsa), wurde von Sandoz (heute Novartis) identifiziert (Bevan et al., 1992).

1.6 Abbau von Endocannabinoiden

1.6.1 Abbau von NAEs

NAEs können durch drei verschiedene Enzyme abgebaut werden: FAAH, FAAH-2, und NAAA (engl. *NAE-hydrolysing acid amidase*) (Cravatt et al., 1996; Wei et al., 2006; Tsuboi et al., 2007). FAAH ist im endoplasmatischen Retikulum vieler Zelltypen lokalisiert und hydrolysiert NAEs mit großer Effizienz (Ahn et al., 2008) (Abb. 4). Generierte FAAH^(-/-)-Mäuse zeigten durchgängig ein erhöhtes Level aller NAEs (Cravatt et al., 2001; Patel et al., 2005). 1993 wurde erstmals nachgewiesen, dass FAAH das Endocannabinoid AEA hydrolysiert (Deutsch und Chin, 1993). Eine Vielzahl an Studien hat seitdem gezeigt, dass FAAH in unterschiedlichen Geweben, z. B. Gehirn, Leber, Testikeln, Uterus, Nieren, okularem Gewebe, Milz, Fett und wahrscheinlich Lunge, aber nicht im skelettalen Muskel oder Herz, nachgewiesen werden kann (Deutsch und Chin, 1993; Desernaud et al., 1995; Cravatt et al., 1996; Matsuda et al., 1997; Watanabe et al., 1998; Maccarrone et al., 2000; Bobrov et al., 2000; You et al., 2011). FAAH gehört zur Familie der AS-Enzyme (Amidase-Signatur-Enzyme). Es weist ein ungewöhnliches katalytisches Trio in Form von Serin-Serin-Lysin auf, welches die Hydrolyse von Amid- und Ester-Gruppen der Fettsäure ermöglicht. Somit hydrolysiert FAAH nicht nur NAEs, einschließlich AEA, PEA und OEA, sondern auch Oleamid und N-Acyltaurin (Ueda et al., 1995; Cravatt et al., 1996; Deutsch et al., 2002; Saghatelian et al., 2004). AS-Enzyme allgemein katalysieren

die Hydrolyse von Amidbindungen (Wei et al., 2006). Die Promoter-Region von FAAH wurde intensiv untersucht. Progesteron und Leptin zielen darauf ab und führen zu einer Hochregulation von FAAH. Estrogene und Glucocorticoide regulieren FAAH herunter (Puffenbarger et al., 2001; Waleh et al., 2002; Maccarone et al., 2003). Es gibt eine Reihe von Substanzen, die FAAH inhibieren, z. B. Arachidonoylserotonin (AA-5TH) oder URB597 (Piomelli et al., 2006; Ahn et al., 2008; Vandevoord, 2008). AA-5HT ist inaktiv an CB₁, fungiert aber als TRPV1-Antagonist (Tzavara et al., 2006). Eine Behandlung mit AA-5HT führte im Gehirn von Ratten zu einer Akkumulation von AEA und 2-AG (de Lago et al., 2005). Darüber hinaus wirkt AA-5HT *in vivo* und *in vitro* anti-proliferativ (Jacobsson et al., 2001; Bifulco et al., 2004). Bei URB597 handelt es sich um einen potenten, selektiven und irreversiblen Carbamat-basierten FAAH-Inhibitor (Mor et al., 2004; Alexander und Cravatt, 2005; Ahn et al., 2007). FAAH-2 ist ein Isoenzym, welches in Primaten, nicht aber in Maus oder Ratte gefunden wurde (Wei et al., 2006). FAAH (auch genannt FAAH-1) und FAAH-2 haben eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung. FAAH findet man in Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum, FAAH-2 hingegen in Lipidtropfen (Kaczocha et al., 2010). Das FAAH-2 Enzym weist 20 % Sequenzanalogie mit FAAH auf und hydrolysiert AEA und OEA weniger effektiv als FAAH (Wei et al., 2006). NAAA ist lysosomal lokalisiert (Tsuboi et al., 2007). NAAA ist kein Struktur analogon zu FAAH und ähnelt strukturell (33 bis 35 %) der N-Acylsphingosin-Amidohydrolase (engl. *acid ceramidase*), welche Ceramide bei saurem pH-Wert zu Sphingosinen und Fettsäuren degradiert (Hong et al., 1999; Tsuboi et al., 2005). Das bevorzugte Substrat für NAAA sind gesättigte NAEs (Tsuboi et al., 2007). Die Signifikanz von FAAH-2 bzw. NAAA für den Katabolismus ist unklar (Hansen und Diep, 2009).

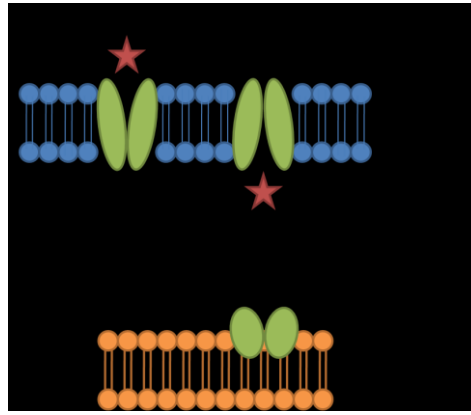


Abb. 4 Schematische Darstellung der Arbeitsweise der FAAH. Anandamid (AEA) wird in die Zelle aufgenommen (dargestellt ist ein postulierter Endocannabinoid-Membrantransporter) und durch die membranständige FAAH, lokalisiert in Mitochondrien und im endoplasmatischem Retikulum, abgebaut. Abbauprodukte sind Arachidonsäure und Ethanolamin. (Deutsch et al., 2002)

1.6.2 Abbau von 2-AG

Obwohl FAAH in der Lage ist, 2-AG zu hydrolysieren (Di Marzo und Deutsch, 1998), steigt das 2-AG-Level in FAAH^(-/-)-Mäusen nicht an (Lichtman et al., 2002). FAAH allein kann also nicht für den Abbau von 2-AG verantwortlich sein. Der ubiquitäre Abbauweg von 2-AG ist MAGL. Die Arbeitsgruppen um Dinh und Makara demonstrierten, dass die durch siRNA verminderte Expression von MAGL sowie die Inhibierung der Lipase zu einer starken Akkumulation von 2-AG führen (Dinh et al., 2004; Makara et al., 2005). Weitere 2-AG-abbauende Enzyme sind die Serin-Hydrolasen ABHD6 und ABHD12 (Marrs et al., 2010; Savinainen et al., 2012).

1.7 Endocannabinoide und Stammzellen

Ein funktionales Endocannabinoidsystem wurde bereits in frühen Stadien der Entwicklung von embryonalen Stammzellen und Trophoblasten nachgewiesen (Paria und Dey, 2000; Maccarrone et al., 2004; Wang et al., 2006; Jiang et al., 2007; Sun und Dey, 2008; Habayeb et al., 2008; Bari et al., 2011). In dieser Phase spielt CB₁ eine fundamentale Rolle bei der Überwachung des embryonalen Wachstums, wohingegen CB₂ eine Rolle bei der Kontrolle der Zellpopulation spielt (Wang et al., 2004). FAAH mRNA konnte ebenfalls in einem frühen Entwicklungsstadium nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass AEA für die embryonale Entwicklung eine wichtige Rolle spielt (Paria et al., 2000). Weiterhin spielt AEA eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Trophoblasten (Wang et al., 1999; Wang und Dey, 2005;

Habayeb et al., 2008; Sun et al., 2010). Bei neuronalen Vorläufer-/Stammzellen spielt das Endocannabinoidsystem via CB₁ eine regulatorische Rolle bezüglich Zell-proliferation, Differenzierung und Migration (Harkany et al., 2007; Diaz-Alonso et al., 2012). CB₂-Rezeptoren, normalerweise abwesend in Neuronen, sind in undifferenzierten neuronalen Zellen aktiv und zusammen mit CB₁ potenziell verantwortlich für Proliferation, Zell-Zyklus-Überwachung und Differenzierung (Palazuelos et al., 2006; Goncalves et al., 2008; Palazuelos et al., 2012). Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von CB₁ und/oder CB₂ in neuronalen Vorläuferzellen die Aktivierung der p42/44-MAPK-Signalkaskade sowie die PI3K/Akt-Kaskade triggert (Galve-Roperh et al., 2013). Ein weiterer Stammzelltyp, für den das Endocannabinoidsystem eine wichtige Rolle spielt, sind hämatopoetische Stammzellen. Eine zentrale Funktion von hämatopoetischen Stammzellen ist ihre kontinuierliche Migration aus (Mobilisierung) und in ("Homing") ihre Stammzellnische im Knochenmark (Bhattacharya et al., 2009). AEA und 2-AG stimulieren Hämatopoese und Migration hämatopoetischer Stammzellen via CB₂ (Valk et al., 1997; Jorda et al., 2002). 2-AG erhöht weiterhin die CFU-GEMM-induzierte (engl. *colony forming unit that generates myeloid cells*; "GEMM" Granulozyten, Erythrozyten, Monocyten, Megakaryozyten) Koloniebildung und Zellmigration durch eine CB₁- und CB₂-abhängige Signalkaskade, wohingegen AEA die Koloniebildung via CB₁ und CB₂ erhöht, die Migration hingegen inhibiert (Patinkin et al., 2008). Der Einfluss von Endocannabinoiden auf die Migration von hämatopoetischen Stammzellen wird via CB₂-Rezeptor moduliert, welcher wiederum die p42/44-MAPK-abhängige Signalkaskade triggert (Galve-Roperh et al., 2013). Weiterhin spielt das Endocannabinoidsystem für Immunzellen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung. Immunzellen exprimieren hauptsächlich CB₂ (Graham et al., 2010). Studien der Arbeitsgruppen um Carayon, Lombard und Sugawara haben gezeigt, dass das Endocannabinoidsystem eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von B-, T- und Mastzellen spielt (Carayon et al., 1998; Lombard et al., 2011, Sugawara et al., 2012). Das Endocannabinoidsystem hat weiterhin einen direkten Einfluss auf die Regulation der Differenzierung von Adipozyten. Ein funktionales Endocannabinoidsystem wurde in humanem Fettgewebe nachgewiesen (Matias et al., 2006; Gasperi et al., 2007). Die Expression von CB₁ steigt im Laufe der Adipogenese (Bensaid et al., 2003; Engeli et al., 2005; Roche

et al., 2007; Pagano et al., 2007). CB₁ stimuliert die Proliferation von Adipozyten (Bellechio et al., 2008). AEA stimuliert die Adipozyten-Differenzierung via CB₁ oder PPAR γ (Bouaboula et al., 2005; Gasperi et al., 2007). Eine weitere wichtige Rolle übernimmt das Endocannabinoidsystem bei der Regulation des Knochenumsatzes. Der Knochenumbau ist ein fortlaufender Prozess aus Ab- und Aufbau von Knochenmasse durch Osteoklasten und Osteoblasten (Takeda, 2008; Naylor und Eastell, 2012). Eine Inhibierung bzw. genetische Inaktivierung von CB₁ führt zu einer defekten Osteoklasten-Differenzierung (Idris et al., 2005). Mesenchymale Stammzellen älterer Menschen tendieren eher zur Differenzierung zu Adipozyten via CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*) und via PPAR als zur Osteoblastendifferenzierung, was ultimativ zu einer Akkumulation von Fett im Knochenmarkkompartiment führt (Gimble et al., 2006). Eine Inhibierung von CB₁ begünstigt diesen Prozess, d. h. CB₁ reguliert die maximale Knochenmasse durch Beeinflussung der Osteoklastenaktivität und schützt gleichzeitig gegen altersbedingten Knochenverlust durch Adipogenese von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) (Idris et al., 2009). Die Rolle von CB₂ bei der Regulierung der Knochenmasse wird kontrovers diskutiert. Erste Studien mit CB₂^(-/-)-Mäusen zeigten einen Phänotyp geringer Knochenmasse mit gleichzeitig gesteigerter Osteoblasten-Menge und eingeschränkter Osteoklastengenese (Ofek et al., 2006). Andere Studien belegen jedoch, dass eine CB₂-Aktivierung zu einer erhöhten Osteoklasten-Formierung führt (Idris et al., 2005). CB₂ spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Knochenbildung. Spezifische CB₂-Agonisten führten in Studien zu einer erhöhten Knochenbildung. Ähnliche Effekte zeigten nicht-selektive Agonisten wie Endocannabinoide und synthetische Cannabinoide (Scutt und Williamson, 2007; Idris et al., 2009; Ofek et al., 2006). Das Endocannabinoidsystem spielt weiterhin eine Rolle bei der Kontrolle der epidermalen Differenzierung. Die Epidermis, die oberste Schicht der Haut, wird durch terminal differenzierte Keratinozyten gebildet (Nemes und Steinert, 1999). AEA inhibiert die Differenzierung humaner Keratinozyten via CB₁ (Maccarrone et al., 2003) durch das Herunterregulieren von Keratin 1 und 10, Transglutaminase 5 und Involucrin (Paradisi et al., 2008). Dieser Effekt von AEA ist das Ergebnis von erhöhter DNA-Methylierung via p38-MAPK- und zu geringerem Anteil p42/44-MAPK-Signalkaskade, getriggert durch den CB₂-Rezeptor. Andere untersuchte Phytocannabinoide wirkten inhibierend auf die

Keratinozytenproliferation über einen CB₁- bzw. CB₂-unabhängigen Signalweg (Wilkinson et al., 2007).

2 Zielstellung

Das Endocannabinoidsystem (Rezeptoren, Liganden, Synthese- und Degradationsenzyme) ist eine attraktive Zielstruktur für verschiedene pharmakotherapeutische Strategien zur Behandlung eines breiten Spektrums an Krankheiten, wie z. B. Angststörungen, Parkinson-Krankheit, Huntington-Krankheit, Multiple Sklerose, Krebs, Arteriosklerose, Fettleibigkeit und Osteoporose (Pacher et al., 2006). Unterschiedliche Komponenten des Endocannabinoidsystems, wie z. B. CB₁, CB₂, TRPV1 und Cannabinoidrezeptor-Liganden, spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebeheilung (Izzo und Camilleri, 2009; Whyte et al., 2009; Kozono et al., 2010; Yu et al., 2010). Ein entscheidender Faktor beim Gewebeheilungsprozess ist die zelluläre Migration. Es konnte nachgewiesen werden, dass Cannabinoide die zelluläre Migration an diversen Stellen im Körper induzieren wie z. B. in Blutgefäßen (Zhang et al., 2010), der Hornhaut (Yang et al., 2010) und im Darmgewebe (Wright et al., 2005). Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass das nicht-psychoaktive Phytocannabinoid Cannabidiol auf ADSCs (engl. *adipose-derived stem cells*) promigrativ wirkt (Schmuhl et al., 2014). Pluripotente mesenchymale Stammzellen spielen durch ihre Fähigkeit zum Ort des Gewebeheilungsprozesses zu migrieren bei einer ganzen Reihe von regenerativen Prozessen eine entscheidende Rolle, wie z. B. im Myokard (Huang et al., 2010) und im Auge (Walker et al., 2010). Weiterhin konnte anhand eines Rattenmodells nachgewiesen werden, dass die Implantation von humanen ADSCs die Regeneration nicht-schließender Brüche fördert (Shoji et al., 2010). Neuere Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass Cannabinoid-Rezeptoren bei Remodelling-Prozessen des Knochengewebes eine wichtige Rolle spielen (Idris et al., 2005, Gimble et al., 2006, Ofek et al., 2006, Scutt und Williamson, 2007; Idris et al., 2009). Bezüglich der molekularen Mechanismen, die den promigratorischen Effekt von Cannabinoiden auf mesenchymale Stammzellen vermitteln, ist bekannt, dass eine CB₂-Rezeptoraktivierung zu einer erhöhten Migration führt (Sophocleous et al., 2011). Außerdem ist gezeigt worden, dass die Aktivierung von p42/44 MAPK ein

essenzieller intrazellulärer Trigger der Stammzellmigration ist (Gao et al., 2009; Yun et al., 2009). Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass Cannabidiol via p42/44 MAPK promigrativ wirkt (Schmuhl et al., 2014). Auf der anderen Seite ist nicht bekannt, welche Rolle die Endocannabinoide AEA und 2-AG bzw. die Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen OEA und PEA bei der Migration von MSCs spielen. Aus diesem Grund rückte das Endocannabinoid-abbauende Enzym FAAH, dessen Hemmung zu einer Verringerung der Degradation und damit indirekt zu einer autokrinen protrahierten Cannabinoid-Wirkung führt (Cravatt et al., 2001; Patel et al., 2005), in den Fokus der vorliegenden Dissertation. Es ist weiterhin bekannt, dass in verschiedenen Fällen eine FAAH-Hemmung mit einer Aktivierung von PPAR α assoziiert ist. Die Arbeitsgruppe um Jhaveri zeigte, dass eine FAAH-Inhibierung zu Analgesie via PPAR α führt (Jhaveri et al., 2008). Justinova et al. demonstrierten, dass FAAH-Inhibitoren den Belohnungseffekt von Nikotin via PPAR α unterdrücken (Justinova et al., 2015). Die Arbeitsgruppe um Mazzola konnte nachweisen, dass FAAH-Inhibitoren die Gedächtnisleistung via PPAR α steigern (Mazzola et al., 2009). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine exogene Zugabe dazu führt, dass Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Verbindungen an PPARs binden und diese aktivieren (O'Sullivan, 2007). In diesem Zusammenhang rückte PPAR α in den Fokus der vorliegenden Arbeit. Ziel der Dissertation war es, den Einfluss der FAAH-Hemmer URB597 und AA-5HT auf das Migrationsverhalten von MSCs und die einer möglichen Modulation zugrunde liegenden Mechanismen im Hinblick auf involvierte Rezeptoren und Signaltransduktoren zu klären. Besonderes Augenmerk galt dabei der Klärung der Rolle von PPAR α .

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1 Liste der verwendeten Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Vertrieb</i>
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Chemi Doc XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mikroskop Axiovert 25 mit Kamera AxioCam ICC1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
AxioScope A.1 mit Kamera	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Neubauer-Zählkammer	Feinoptik, Bad Blankenburg, D
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Sterilbank	Nunc, Wiesbaden, D
Vortexer REAX top	Heidolph, Schwabach, D
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge mit Kühlung 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Rollenmischer	Ratek, Boronia, Victoria, Australien
Rollenmischer RM5-30V	CAT, Staufen, D
MACS	BD Biosciences, Heidelberg, D
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Multipette® stream	Eppendorf, Hamburg, D
Absorptionsreader	Anthos, Krefeld, D
Tecan	Tecan, Crailsheim, D
Gelelektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Zellschaber	Carl Roth GmbH, München, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Absaugsystem Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald, D
Einfrierhilfe	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA

3.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 Liste der benutzten Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Vertrieb</i>
0,5/1,5/2-ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, D
15/50-ml-Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, D
96-Well-Platten	BD Biosciences, Heidelberg, D
24-Well-Platten	BD Biosciences, Heidelberg, D
6-Well-Platten	BD Biosciences, Heidelberg, D
4-Well-Platten	BD Biosciences, Heidelberg, D
Pipettenspitzen (10/100/1000/2000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
serologische Einmalpipetten aus Polystyren (2/5/10/25 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, D
0,5-ml-Combitips	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilfilter (40 µm/100 µm)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Aussaatschalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen (T75er)	BD Biosciences, Heidelberg, D
ELISA-Platten	BD Biosciences, Heidelberg, D
gestopfte Spitzen (100 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Nitrozellulosemembran	Carl Roth GmbH, München, D
Culture Slides für Mikroskopie	BD Biosciences, Heidelberg, D

3.3 EDV-Programme

Tabelle 3 Liste der verwendeten Programme

<i>Software</i>	<i>Vertrieb</i>
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Quantity One 1-D Analysis Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

3.4 Methoden

3.4.1 Zellbiologische Methoden

3.4.1.1 Stammzellisolierung

30 ml Fettgewebe¹ wurden vorsichtig mit einer serologischen Einmalpipette abgenommen und in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden jeweils 5 ml Kollagenase NB4 Standard Grade und PBS (mit Kalzium und Magnesium) zugegeben, was einer Kollagenasekonzentration von 6 mg/ml entsprach. Der enzymatische Verdau wurde 30 min bei 37 °C und 100 rpm durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gewebe über einen 100-µm-Filter in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml PBS (mit 10 % FKS) gewaschen. Es folgte ein 10-min-Sedimentationsschritt. Die flüssige Fraktion wurde über einen 40-µm-Filter in ein neues 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurden die flüssige Fraktion und das „Fettgewebe“ 10 min bei 400 g (bei Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand in beiden Zentrifugenröhrchen wurde vorsichtig abgesaugt. Die Pellets wurden in 10 ml PBS (mit 10 % FKS) resuspendiert und vereinigt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (s.o.). Zum Schluss wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 12 ml ADSC-Expansionsmedium resuspendiert. Die Aussaat erfolgte in einer 75-cm²-Zellkulturflasche (Passage 0). Nach einer Inkubation von 24 h (37 °C, 5 % CO₂) erfolgte die CD34⁺-Trennung.

¹ Die Spender wurden über die Verwendung informiert und haben der wissenschaftlichen Nutzung zugestimmt.

Materialienliste 1 Stammzellisolierung

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
Fettgewebe	Ästhetik-Klinik, Dr. Weber, Rostock, D
Kollagenase NB4 Standard Grade	Serva, Heidelberg, D
PBS (mit Kalzium und Magnesium)	PAN Biotech, Aidenbach, D
<u>PBS (mit 10 % FKS):</u>	
500 ml PBS (ohne Kalzium und Magnesium)	ebenda
50 ml FKS	ebenda
<u>ADSC-Expansionsmedium:</u>	
10 % FKS	ebenda
1 % Penicillin/Streptomycin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
DMEM mit GlutaMAX™-I, 4,5 g/l	Ebenda
D-Glucose	

3.4.1.2 Immunomagnetische Zellseparation von CD34⁺-Zellen

MACS (engl. *Magnetic Activated Cell Sorting*) ist ein Verfahren zur spezifischen Isolierung einer Zellpopulation anhand charakteristischer Oberflächenantigene. Dabei werden Beads, mikroskopisch kleine magnetische Partikel, an die ein spezifischer Antikörper gekoppelt ist, verwendet. Diese Beads haben keinerlei Einfluss auf die Struktur oder die Funktion der gebundenen Zellen. Setzt man Zell-Beads-Komplexe einem Magnetfeld aus, werden diese zurückgehalten. Zellen, an die keine Beads gebunden sind, können ungehindert passieren. Man trennt somit die Zellpopulation in eine Negativfraktion (Zellen ohne Beads) und eine Positivfraktion (Zellen mit Beads). Nach dem Entsorgen der Negativfraktion kann das Magnetfeld entfernt und die Positivfraktion gesammelt werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Separationsstrategie handelt es sich um eine Positivselektion.

Zur Durchführung:

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden erneut 12 ml ADSC-Expansionsmedium zugegeben. Es folgte eine mikroskopische Begutachtung der Zelldichte zur empirischen Ermittlung der benötigten Menge CD34⁺-Beads. Im optimalen Fall wurden pro Zelle 3 bis 4 Beads gebunden. Die benötigte Menge Beads, im Durchschnitt 25 - 35 µl, wurde in 7 ml PBS/0,1 % BSA aufgenommen und einem Magnetfeld ausgesetzt. Der Überstand wurde abgesaugt und die gewaschenen Beads in entsprechender Menge ADSC-Expansionsmedium aufgenommen (2,5 - 3,5 ml). Es wurden zur

Sicherheit 5 µl Beads zusätzlich gewaschen. Das ADSC-Expansionsmedium der Zellkulturflasche wurde abgenommen und die entsprechende Menge gewaschener Beads gelöst in Medium (ebenda) zugegeben. Es folgte eine 5- bis 10-min-Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit anschließender mikroskopischer Kontrolle. Wenn nötig wurden die restlichen Beads dazugegeben. Es folgten ein zweimaliger Waschschrift mit PBS und die Zugabe von 1 ml Trypsin (3.4.1.4), welches sofort durch Schwenken der Flasche verteilt wurde. Nach 5-min-Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) und mikroskopischer Kontrolle folgte die Aufnahme der Zellen in 7 ml PBS (mit 10 % FKS) und die Überführung der Zellsuspension in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen. Letzteres wurde anschließend 8 min bei 4 °C auf den Rollenmischer gelegt. Danach wurde die Zellsuspension über einen 40-µm-Filter in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, anschließend in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und an den Magneten gehalten. Der Überstand wurde abgesaugt. Die Zell-Bead-Komplexe wurden in 7 ml PBS (mit 0,1 % BSA) aufgenommen und erneut für 8 min bei 4 °C auf den Rollenmischer gelegt. Im Anschluss wurde das 15-ml-Zentrifugenröhrchen wieder an den Magneten gehalten. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zell-Bead-Komplexe wurden in 12 ml ADSC-Expansionsmedium aufgenommen und in eine 75-cm²-Zellkulturflasche ausgesät (Passage 1).

Materialienliste 2 CD34⁺-Trennung

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
Dynabeads® CD34 Positive Isolation Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
<u>PBS (0,1 % BSA)</u>	
500 ml PBS	3.4.1.1
0,5 g BSA	Sigma, Taufkirchen, D
ADSC-Expansionsmedium	3.4.1.1
PBS (ohne Kalzium und Magnesium)	Ebenda
Trypsin/EDTA	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
PBS (mit 10 % FKS)	3.4.1.1

3.4.1.3 Kultivierung von ADSCs

ADSCs wurden in ADSC-Expansionsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ bis Passage drei kultiviert (3.4.1.4). Dreimal in der Woche erfolgte ein Mediumwechsel. Die Langzeitversuche zur Osteogenese wurden mit verminderter Serumkonzentration (5 %) im Expansionsmedium durchgeführt. Sämtliche Versuche mit entsprechenden Testsubstanzen, gelöst in Ethanol oder DMSO, wurden in Passage 4 durchgeführt (0,1 % v/v Ethanol bzw. DMSO). Als Vehikelkontrolle diente PBS (3.4.1.1), welches entsprechend in Ethanol bzw. DMSO gelöst wurde.

Materialienliste 3 Kultivierung von ADSCs

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
<u>5 % ADSC-Expansionsmedium:</u>	
5 % FKS	3.4.1.1
1 % Penicillin/Streptomycin	ebenda
DMEM mit GlutaMAX™-I, 4,5 g/l D-Glucose	Ebenda
<u>Testsubstanzen:</u>	
URB597	Biomol GmbH, Hamburg, D
AA-5HT	ebenda
AEA	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D
2-AG	Biomol GmbH, Hamburg, D
OEA	ebenda
PEA	ebenda
AM-251	ebenda
AM-630	ebenda
Capsazepin	Sigma, Taufkirchen, D
GW6471	Biomol GmbH, Hamburg, D
WY-14643	ebenda
SB203580	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D
PD98059	InvivoGen, Toulouse, F
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethanol	Apotheke Universitätsmedizin Rostock

3.4.1.4 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bei einem Konfluenzgrad von ~ 80 % passagiert und in neuen Kulturflaschen ausgedünnt. Überkonfluente Zellen würden anfangen zu differenzieren oder sich zu überlagern. Zum Passagieren wurde zunächst das ADSC-Expansionsmedium abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen, um das die Trypsin-Reaktion störende Serum vollständig zu entfernen. Trypsin schädigt die Zellmembran und zelluläre sowie interzelluläre Mucoproteine, wodurch es zur Ablösung adhärenter Zellen vom Boden der Zellkulturflasche

kommt. Solange die Einwirkzeit nicht zu groß gewählt ist, schädigt Trypsin die Zellen nicht und greift nur extrazelluläre Proteine an. Trypsin kann durch den Einsatz von Serum gehemmt werden, da es Trypsin-Inhibitoren enthält. Das PBS wurde abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen mit 1 ml Trypsin/EDTA einmal überschichtet und 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. EDTA sorgt hierbei als Ca²⁺-Chelator dafür, dass Zell-Zell-Verbindungen gelöst werden. Im Folgenden wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen sich vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten. Die Trypsin-Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von mindestens des doppelten Volumens Medium gestoppt, i.d.R. 4 ml/Flasche. Danach wurde die Flasche gründlich gespült, die Zellsuspension in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem angemessenen Volumen ADSC-Expansionsmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen 1:3 in Kulturflaschen mit 75 cm² Oberfläche. Beim Passagieren von Zellen in Passage drei erfolgte kein 1:3-Splitten der Zellen. An dieser Stelle wurde nach dem Resuspendieren die Zellzahl mittels Neubauerkammer bestimmt (3.4.1.6). Entsprechend dem experimentellen Ansatz erfolgte anschließend die Aussaat (Tabelle 4). 24 h nach Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel.

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Zellkonzentrationen/cm² sowie verwendete Kulturvolumina für die experimentelle Zellaussaat entsprechend der Zellkulturfläche

<i>Zellkulturfläche</i>	<i>Fläche in cm²</i>	<i>Aussaatvolumina</i>	<i>Zellen pro Fläche (20000/cm²)</i>
96-Well-Platte	0,34 cm ²	100 µl	6800
24-Well-Platte	1,90 cm ²	600 µl	38000
6-Well-Platte	9,60 cm ²	2000 µl	192000
4-Well-Platte	1,90 cm ²	600 µl	38000

Materialienliste 4 Passagieren von Zellen

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
PBS	3.4.1.1
ADSC-Expansionsmedium	Ebenda
Trypsin/EDTA	3.4.1.2

3.4.1.5 Auftauen von Zellen

Beim Auftauen der Zellen wurde beachtet, dass DMSO (enthalten im Kryomedium) bei längerer Einwirkung eine zelltoxische Wirkung hat. Somit musste dieser Prozess schnell erfolgen. Die aufzutauende Zellsuspension wurde im Wasserbad bei 37 °C so weit aufgetaut, bis sie sich in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit 10 ml ADSC-Expansionsmedium überführen ließ. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1400 rpm für 5 min zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in entsprechender Menge ADSC-Expansionsmedium resuspendiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1400 rpm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 ml ADSC-Expansionsmedium resuspendiert und in einer 75-cm²-Zellkulturflasche ausgesät. 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel.

Materialienliste 5 Auftauen von Zellen

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
ADSC-Expansionsmedium	3.4.1.1

3.4.1.6 Zellzahlbestimmung

Aus der homogenisierten Zellsuspension wurden 20 µl entnommen und in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen anschließend pro Großquadrat gezählt und der Mittelwert der vier Großquadrate ermittelt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = A \times V \times 10^4$$

- A – Mittelwert der Zellzahlen in den Großquadraten
- V – Volumen der Zellsuspension
- $\times 10^4$ – Neubauer-Faktor

3.4.1.7 Osteogene Differenzierung

Zur osteogenen Differenzierung wurden die Zellen 28 Tage (14 Tage) mit Osteogenese-Medium kultiviert (Positivkontrolle).

Materialienliste 6 osteogene Differenzierung

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
<u>Osteogenese-Medium:</u>	
4 ml 10 x Osteogenese-Mix	
36 ml ADSC-Expansionsmedium	3.4.1.1
<u>10 x Osteogenese-Mix:</u>	
48,23 ml Aqua ad iniectabilia Fresenius	Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
1250 µl Ascorbinsäure (10 g/l)	Sigma, Taufkirchen, D
25 µl Dexamethason (2 mM)	ebenda
500 µl β -Glycerolphosphat (1 M)	ebenda

3.4.1.8 MTS-Färbung

Die MTS-Färbung ist ein kolorimetrischer Test zur indirekten Lebendzellzahlbestimmung. Konkret beruht dieser Test auf der Bestimmung der *in vitro*-Vitalität, indem die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen wird. MTS ist ein Tetrazoliumsalz und wird von lebenden Zellen aufgenommen und durch Dehydrogenasen zu einem photometrisch quantifizierbaren Formazansalz reduziert. Die Konversionsrate korreliert dabei linear mit der Lebendzellzahl.

Zur Durchführung:

Eine 96-Well-Platte mit konfluenten Zellen wurde mit frischem Medium (100 µl/Well) und MTS (20 µl/Well) für 1 h im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Je 100 µl Überstand wurden in eine ELISA-Reader-Platte überführt. Die Quantifizierung des Formazansalzes erfolgte bei 490 nm in einem Absorptionsreader (Negativkontrolle = Medium + MTS ohne Zellen). Die Höhe des Hintergrundes (z. B. durch Zelltrümmer oder Fingerabdrücke auf der Platte) wurde bei 630 - 700 nm bestimmt.

Materialienliste 7 MTS-Färbung

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
CellTiter 96 [®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim, D
ADSC-Expansionsmedium	3.4.1.1

3.4.1.9 Kristallviolett-Färbung

Bei der Kristallviolett-Färbung (KV, N-Hexamethylpararosanilin, 61135_FLUKA) handelt es sich um einen Zytotoxizitätstest. Der Farbstoff ist in lebenden Zellen nachweisbar und kann durch Zugabe von Essigsäure wieder herausgelöst werden. Die entstehende Farblösung ist photometrisch quantifizierbar. Die Extinktion korreliert dabei direkt mit der vorliegenden Zellzahl. Die KV-Färbung gibt somit eine quantitative Aussage über die Vitalität einer *in vitro*-Kultur, denn nur lebensfähige Zellen nehmen den Farbstoff auf.

Zur Durchführung:

Die KV-Färbung wurde, in derselben 96-Well-Platte, direkt im Anschluss an die MTS- Färbung durchgeführt. Dabei wurden die Wells zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit Isopropanol (100 µl/Well) fixiert. Im Anschluss wurden die Wells dreimal mit PBS/Tween[®] 20 (0,05 %) gewaschen und für 20 min mit KV (50 µl/Well) überschichtet. Überschüssiges KV wurde anschließend durch vier- bis fünfmaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt. Es folgte die Zugabe von 33%iger Essigsäure (100 µl/Well). Die 10- bis 15-min-Inkubation erfolgte auf dem Plattenrüttler. Je 70 µl Überstand wurden in eine ELISA-Reader-Platte überführt. Die Messung erfolgte in einem Absorptions-reader (600 nm).

Materialienliste 8 Kristallviolett-Färbung

Material	Vertrieb
PBS	3.4.1.1
Isopropanol	Serva, Heidelberg, D
<u>PBS/Tween® 20 (0,05 %):</u>	
50 ml PBS	3.4.1.1
25 µl Tween® 20	Sigma, Taufkirchen, D
<u>Kristallviolett (KV):</u>	
50 mg KV	ebenda
50 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage
<u>Essigsäure (33 %):</u>	
15 ml Essigsäure	Sigma, Taufkirchen, D
30 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage

3.4.1.10 Alkalische-Phosphatase-Färbung

Alkalische Phosphatasen (GenBank: AAB59378.1) sind unspezifische Phosphomono-esterasen. Sie arbeiten optimal bei hohen pH-Werten und gelten als Knochenmarker. Para-Nitrophenylphosphat (pNpp) ist ein Substrat der alkalischen Phosphatasen. Die Reaktion führt zur Bildung von para-Nitrophenol, was unter alkalischen Bedingungen intensiv gelb und löslich ist. Die Produktbildung kann mittels Absorbtiionsreader gemessen werden und dient der quantitativen Bestimmung der alkalischen Phosphatase.

*Zur Durchführung:*

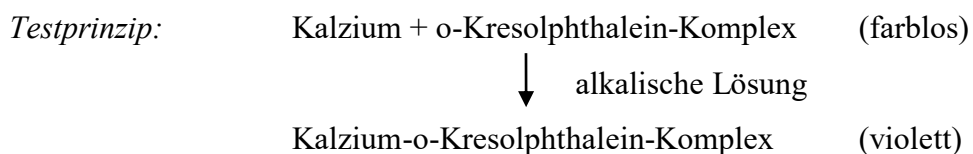
Die Zellen (96-Well-Platte) wurden zunächst zweimal mit TBS gewaschen und anschließend mit Lyse-Puffer (50 µl/Well, PMSF frisch dazu gegeben) überschichtet (10 min, bei Raumtemperatur). Anschließend wurden 200 µl/Well Messpuffer hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) für eine Stunde. Die Reaktion wurde daraufhin mit 85 µl/Well 2 M NaOH gestoppt. Je 200 µl Überstand wurden in eine ELISA-Reader-Platte überführt. Die Messung erfolgte bei 405 nm in einem Absorbtiionsreader. Waren die gemessenen Werte außerhalb des Messbereiches des Absorbtiionsreader, wurden die Überstände entsprechend (1:4, 1:8, 1:16, 1:32) mit TBS verdünnt.

Materialienliste 9 Alkalische-Phosphatase-Färbung

Material	Vertrieb
<u>TBS:</u>	
8 g NaCL (137 mM)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
0,2 g KCl (2,7 M)	ebenda
6,1 g Tris (50 mM)	ebenda
1000 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage
pH = 7,4	
<u>Lyse-Puffer:</u>	
990 ml TBS	
10 ml Tween® 20	3.4.1.9
frisch dazugeben: 100 µl PMSF (100 x)	
<u>PMSF 100 x:</u>	
0,069 g PMSF	Sigma, Taufkirchen, D
40 ml Isopropanol	3.4.1.9
<u>Messpuffer:</u>	
0,185 g pNpp	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
5 ml 10 x AMPED (5,3 g AMPED, 50 ml Aqua dest., pH = 10)	Sigma, Taufkirchen, D
5 ml 10 x MgCl ₂ (0,508 g, 50 ml Aqua dest.)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
40 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage

3.4.1.11 Kresolphthalein-Färbung (Kreso-Färbung)

Bei der Kresolphthalein-Färbung handelt es sich um einen Test zur Quantifizierung der *in vitro*-Kalzifikation. Er ermöglicht, die Konzentration der Kalziumionen in der extrazellulären Matrix photometrisch als Endpunktanalyse zu quantifizieren. Die Farbintensität des gebildeten violetten Komplexes ist direkt proportional der Kalziumkonzentration. Da diese Reaktion laut Weltgesundheitsorganisation auch mit Magnesium-, Strontium-, Barium- und SO₄²⁻-Ionen stattfinden würde, wird der Kresolphthaleinlösung 8-Hydroxy-chinolin zugesetzt, das mit vielen ein- und zweiwertigen Metallionen unlösliche Chelatkomplexe bildet. Die Salzsäure hilft, die Kalziumionen aus der Matrix zu mobilisieren. Das Protokoll folgt den Vorschlägen der WHO (engl. *Calcium-O-Cresolphthalein Complexone Method*).



Zur Durchführung:

Die Zellen (96-Well-Platte) wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 7 min mit 4 % PFA fixiert. Danach erfolgten zwei weitere Waschschrte mit Aqua dest. sowie die Zugabe von 100 µl/Well Kresolphthalein-Lösung (5-min-Inkubation). Im Anschluss wurde pro Well 100 µl AMP-Puffer hinzugegeben (15-min-Inkubation). Je 100 µl Überstand wurden in eine ELISA-Reader-Platte überführt. Die Messung erfolgte bei 580 nm in einem Absorbtiionsreader.

Materialienliste 10 Kresolphthalein-Färbung

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
PBS	3.4.1.1
PFA (4 %)	Sigma, Taufkirchen, D
Aqua dest.	hausinterne Anlage
<u><i>Kresolphthalein-Lösung:</i></u>	
2,5 mg o-Kresolphthalein Komplex	Sigma, Taufkirchen, D
25 mg 8-Hydroxychinolin (8-Quinolinol)	ebenda
23,5 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage
1,5 ml 37 % Salzsäure	Sigma, Taufkirchen, D
<u><i>AMP-Puffer:</i></u>	
3,8 ml AMP	ebenda
21,2 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage
180 µl 37 % Salzsäure (pH = 7,4)	Sigma, Taufkirchen, D

3.4.1.12 Migrationsassay

Unter Chemotaxis versteht man das Phänomen, dass die Fortbewegung einer Zelle durch einen extrazellulären Gradienten einer Chemikalie beeinflusst wird. Der am weitesten verbreitete Chemotaxisassay ist der Boyden-Kammer-Transwell-Assay. Die Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, die durch eine poröse Membran getrennt sind. Dabei werden in das Insert Zellen in serumfreiem Zellkulturmedium mit der zu testenden Substanz eingebracht und in das untere Kompartiment serumhaltiges Zellkulturmedium als Chemoattraktant. Durch Diffusion bildet sich ein Konzentrationsgradient, den die Zellen versuchen entlang zu wandern. Nach abgelaufener Inkubationszeit werden die migrierten Zellen via WST-1 ermittelt.

Zur Durchführung:

Zu Beginn wurden die Inserts steril in die Wells einer 24-Well-Platte gesetzt und ausgerichtet. Pro Insert wurden 1×10^5 Zellen in 250 μl serumfreien ADSC-Expansionsmedium ausgesät. Erfolgte keine Präinkubation, wurden 250 μl serumfreies ADSC-Expansionsmedium mit doppelter Konzentration der entsprechenden Testsubstanz in das Well gegeben. Es folgte eine kurze Einwirkzeit (ca. 5 min). War eine Präinkubation vorgesehen, wurden 200 μl serumfreies ADSC-Expansionsmedium mit der entsprechenden Testsubstanz (Konzentration für 500 μl) hinzugegeben. Es folgte eine 1-h-Inkubation (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurde 50 μl serumfreies ADSC-Expansionsmedium (mit Testsubstanz) entsprechend einer Konzentration für 500 μl hinzugegeben, sodass sich am Ende 500 μl im Insert befanden. Es folgte eine kurze Einwirkzeit (ca. 5 min). Die Migration wurde durch Zugabe von 750 μl serumhaltigem ADSC-Expansionsmedium in das untere Kompartiment gestartet. Die Platten wurden 6 h (bei 37 °C, 5 % CO₂) inkubiert (bei Zeitverlaufsexperimenten wurde der Zeitraum entsprechend angepasst). Zur Messung wurde eine 24-Well-Platte vorbereitet, indem 200 μl serumfreies ADSC-Expansionsmedium mit 20 μl WST-1 in einer entsprechenden Anzahl Wells vorgelegt wurden. Das ADSC-Expansionsmedium aus den Inserts wurde abgesaugt und der Zellrasen währenddessen vorsichtig von der Oberfläche der Membran entfernt. Je 500 μl serumfreies ADSC-Expansionsmedium wurde in die Inserts gegeben und mit einem Wattestäbchen die letzten Zellreste entfernt. Die Inserts wurden aus der 24-Well-Platte entnommen und in die vorbereitete Messplatte umgesetzt. Nach 90 min erfolgte die Messung (analog 3.4.1.13).

Materialienliste 11 Migration

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
ADSC-Expansionsmedium	3.4.1.1
Testsubstanzen	3.4.1.3
WST-1	Roche Applied Science, Mannheim, D

3.4.1.13 *WST-1-Test*

Bei dem WST-1-Test (engl. *water-soluble tetrazolium*) handelt es sich um einen Viabilitäts-Test zum Nachweis einer intakten Atmungskette. Viable Zellen bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliums Salzes WST-1 in das dunkelrote Formazan. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden.

Zur Durchführung:

Die Zellen (96-Well-Platte) wurden zunächst 6 h mit der entsprechenden Testsubstanz (bei 37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurde WST-1-Reagenz (10 %) hinzugegeben und die Inkubation fortgesetzt, bis ein markanter Farbumschlag erkennbar war (ca. 30 min). Die Messung erfolgte bei 450 nm (Referenzfilter 690 nm) in einem Absorbitionsreader.

Materialienliste 12 WST-1-Test

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
WST-1	3.4.1.12
Testsubstanzen	3.4.1.3

3.4.1.14 *Scratch-Assay*

Für den Scratch-Assay wurden die Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Tag der Stimulation wurden mithilfe einer 100-µl-Pipettenspitze drei parallele „Risse“ (Scratch) in den Zellrasen eingefügt. Dabei wurde die Pipettenspitze vorsichtig am oberen Rand des Wells angesetzt und anschließend langsam, aber mit einer fließenden Bewegung, an das untere Ende des Wells gezogen. Der Deckel der 6-Well-Platte diente dabei als Führungslinie. Nachdem alle drei „Risse“ pro Well gesetzt waren, wurden diese mit PBS gewaschen, um die Zelltrümmer im Überstand zu entfernen. Anschließend wurde erneut ADSC-Expansionsmedium sowie die Testsubstanz in entsprechender Konzentration zugegeben. Die Risse/Well wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ fotografisch dokumentiert. Nach 24 h (bzw. 12 h bei AA-5HT) wurden die Risse unter dem Mikroskop begutachtet und erneut fotografiert.

Materialienliste 13 Scratch-Assay

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
PBS	3.4.1.1
ADSC-Expansionsmedium	ebenda
Testsubstanzen	3.4.1.3

3.4.1.15 Vorbereitung LC-MS

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen (5 ml/Aussaatschale) und 4,5 ml/Aussaatschale serumfreies ADSC-Expansionsmedium zugegeben. Nach 3-h-Inkubation (bei 37 °C, 5 % CO₂), wurden die Zellen mit URB597 (10 µM), AA-5HT (10 µM) bzw. Vehikel stimuliert. Es folgte eine weitere 6-h-Inkubation. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml kaltem PBS überschichtet und mit dem Zellschaber abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und auf Eis gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand bis auf ~ 10 ml abgesaugt. Die Zellen wurden resuspendiert und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 5 min, 4 °C). Das Medium wurde komplett abgesaugt. Die Zellen wurden durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bis zur LC-MS-Messung bei -80 °C gelagert.

Materialienliste 14 Vorbereitung LC-MS

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
PBS	3.4.1.1
ADSC-Expansionsmedium	ebenda
Testsubstanzen	3.4.1.3
Flüssigstickstoff	hausinterne Anlage

3.4.1.16 LC-MS

Unter LC-MS versteht man die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie. Diese Kopplung ermöglicht Nachweise bis in den unteren Femtobereich, die Detektion von Molekülmassen und die Durchführung von MS/MS-Untersuchungen unmittelbar nach der chromatographischen Auftrennung. Das Eluat von der Chromatographiesäule wird nach einer Trennung in ein Elektrospray-MS geleitet, in dem die aufgetrennten

Proteinmoleküle nacheinander die Ionenquelle erreichen, ionisiert und dann bestimmt werden (Lottspeich und Engels, 2012).

Zur Durchführung:

Die LC-MS wurde entsprechend einem etablierten Protokoll durchgeführt (Ivanov et al., 2015). Die Zellpellets wurden in 1 ml 20 mM Tris-HCl Puffer (pH = 6,8) mit 20 ng/ml AEA-d₈ resuspendiert und via Sonopols U-tip Sonifier (Bandelin, Berlin, D) lysiert (dreimal mit 15 x 5 s Puls bei 75 %, gefolgt von einer 60 s Pause). Die Lysate wurden anschließend parallel zu den Standards mit der in der Arbeitsgruppe etablierten Methode extrahiert und analysiert (Ivanov et al., 2015). Die Proben (30 - 60 µl) wurden via HPLC separiert, wobei eine Multospher[®] 120 C18 Säule (125 x 2 mm, 5 µm Partikelgröße, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, D) zusammen mit einer Schutzsäule (20 x 2 mm, 5 µm) verwendet wurde. Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen wurden mittels mobiler Phase A (Wasser mit 0,2 % Ameisensäure) bzw. B (Acetonitril/2-Propanol (60:40, v/v) mit 0,2 % Ameisensäure) eluiert (Flussrate 0,15 ml/min). Das Elutionsschema sah folgendermaßen aus: lineare Steigerung der mobilen Phase B von 65 % auf 80 % in 10 min, isokratisch bei 80 % in 3 min und linear zu 100 % Phase B in den weiteren 6 min. Anschließend wurde das System reequilibriert bei 35 % Phase A über 4 min. Im Anschluss an die HPLC folgte eine ESI-MS (Micromass Quattro Micro TM API Massenspektrometer (Waters, Milford, MA)): m/z 300,8 für PEA, m/z 326,8 für OEA, m/z 348,8 für AEA, m/z 379,8 für 2-AG und m/z 356,8 für den internen Standard (AEA-d₈). Die Einstellungen des Massenspektrometers waren wie folgt: Kapillarenspannung 3,5 kV; Kegelspannung 20 und 24 V für AEA/AEA-d₈/2-AG und PEA/OEA, Quelltemperatur 120 °C; Desolvatationstemperatur 350 °C; Flussrate des Desolvatationsgases 700 l/h. Verweil- und Verzögerungszeiten 0,05 s und 0,1 s. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels MassLynx Software Version 4.1 (Micromass Ltd., Manchester, UK).

Materialienliste 15 LC-MS

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
Tris-HCl Puffer (pH = 6,8)	3.4.2.3
AEA-d ₈	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, D
Acetonitril	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
2-Propanol	Serva, Heidelberg, D
Ameisensäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

3.4.1.17 Mikroskopie mit Axio Scope 1.A

Für die mikroskopischen Versuche wurden die Zellen in einem 4-Well-Slide ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h erfolgte die Stimulation. Zur Stimulation wurden die Zellen 3 h auf serumfreies Zellkulturmedium gesetzt und anschließend mit den entsprechenden Testsubstanzen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS (250 µl/Well) gewaschen und mit 200 µl PFA (4 %) (1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C) überschichtet. Es folgte ein weiterer Waschschrift (ebenda). Zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes wurden die Zellen zunächst 1 h bei Raumtemperatur mit PBS (5 % FKS, 0,3 % Triton[®] X-100) blockiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen (PBS) und für 1 h mit 200 µl Primärantikörper (Anti-PPAR; PBS (1 % FKS, 0,3 % Triton[®] X-100), bei Raumtemperatur) behandelt. Ab diesem Zeitpunkt wurde möglichst dunkel gearbeitet. Es folgte ein weiterer Waschschrift (PBS) und die Zugabe von 200 µl/Well Sekundärantikörper (Anti-Maus, PBS (1 % FKS, 0,3 % Triton[®] X-100, Raumtemperatur). Nach einer Stunde wurden die Zellen gewaschen und pro Well 200 µl Bisbenzimidlösung (20 µl auf 5 ml PBS (1 % FKS, 0,3 % Triton[®] X-100, Raumtemperatur) hinzugegeben. Es folgte eine 30-min-Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen gewaschen (PBS) und das Medium komplett abgesaugt. Der Aufsatz wurde vom Objektträger gelöst und ein Deckglas mithilfe von einem Tropfen 20 % Glycerin in PBS pro Well fixiert. Die Culture Slides wurden in Alufolie im Kühlschrank gelagert. Die Visualisierung der Antikörper-Bindung und der Nuklei erfolgte mittels Axio Scope 1.A von Zeiss (Jena, D). Die Bestimmung des PPAR α im Nuklus erfolgte durch Überlagerung der nukleären Regionen (Bisbenzimidfärbung) und Alexa Fluor[®] 488-gelabeltem PPAR α .

Materialienliste 16 Mikroskopie Axio Scope 1.A

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
PBS	3.4.1.1
FKS	Ebenda
ADSC-Expansionsmedium	Ebenda
Testsubstanzen	3.4.1.3
PFA (4 %)	3.4.1.11
Triton® X-100	Sigma, Taufkirchen, D
Bisbenzimid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Glycerin	Ebenda
Anti-PPAR	Abcam, Cambridge, UK
→1:500 in PBS (1 % FKS, 0,3 % Triton® X-100)	
Anti-Maus Alexa Fluor® 488	Ebenda
→1:1000 in PBS (1 % FKS, 0,3 % Triton® X-100)	

3.4.2 Proteinchemische Methoden**3.4.2.1 Ernte von Zelllysaten mit Kralewski-Puffer**

Die Zelllyse ist ein wichtiger Schritt für die anschließende Analytik, da hier die Zellen zerstört und die zu untersuchenden Proteine gelöst werden. Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Lyse-Puffer, welche sich hauptsächlich in ihrer Effektivität Proteine zu lösen unterscheiden. Ein wichtiges Kriterium bei der Wahl des Lyse-Puffers ist, ob die später verwendeten Antikörper in der Lage sind, Proteine in ihrer denaturierten Form zu binden oder nicht. Der verwendete Kralewski-Puffer besteht aus HEPES, NaCl, Triton® X-100, EDTA und Glycerin. Bei der Verwendung als Lyse-Puffer werden noch Aprotinin, PMSF, Leupeptin und ortho-Vanadat hinzugefügt. Ein Großteil der Bestandteile sind Protease/Phosphatase Inhibitoren. Von den restlichen Bestandteilen dient HEPES (pH = 7,4) als Puffersubstanz mit einer guten Pufferkapazität zwischen pH = 6,8 – 8,2 (Good et al., 1966). NaCl dient zum Erhalt des ionischen Mediums. Triton® X-100 ist nicht-denaturierend und schädigt die Zellmembran (Sigma Aldrich Produkt Information), Glycerin dient zur Stabilisierung des gelösten Proteins.

Tabelle 5 Übersicht über die im Kralewski-Puffer verwendeten Inhibitoren und deren Effekt (Quelle: Western Blotting - A Beginner's Guide - Abcam)

<i>Inhibitor</i>	<i>inhibierte Protease/Phosphatase</i>
Aprotinin	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin
Leupeptin	Lysosomale Proteasen/Phosphatasen
PMSF	Serin-, Cystein-Proteasen
EDTA	Metalloproteasen, benötigen Mg^{2+}/Mn^{2+}
ortho-Vanadat	Tyrosin-Phosphatase

Zur Durchführung:

Dieser Versuch wurde komplett auf Eis durchgeführt. Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Wells anschließend einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde gründlich abgesaugt und die Zellen mit 80 µl/50 µl (6-Well-Platte/24-Well-Platte) Lyse-Puffer pro Well überschichtet. Mit einem Zellschaber wurde anschließend die gesamte Welloberfläche abgeschabt und mit dem Lyse-Puffer in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß aufgenommen. Zum Lysieren wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt, wobei periodisch gevortext wurde. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 U/min (5 min). Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, das Pellet wurde verworfen. Zum Schluss wurden 10 µl des Überstandes für die Proteinbestimmung abgenommen und in ein 0,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei -20 °C weggefroren.

Materialienliste 17 Ernte von Zelllysaten mit Kralewski-Puffer

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
<i>PBS</i>	3.4.1.1
<u><i>Lyse-Puffer:</i></u>	
1,0 ml Kralewski-Puffer (4 °C)	
5,2 µl Aprotinin (1,9 mg/ml; 4 °C)	Sigma, Taufkirchen, D
10,0 µl PMSF (100 mM; 4 °C)	Ebenda
2,0 µl Leupeptin (1,9 µg/µl; -20 °C)	Ebenda
5,0 µl ortho-Vanadat (100 mM; 4 °C)	Ebenda
<u><i>Kralewski-Puffer:</i></u>	
5,89 g Hepes (50 mM; pH = 7,4)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
4,38 g NaCl (150 mM)	Ebenda
5 ml Triton® X-100 (1 %, Fluka)	3.4.1.15
0,146 g EDTA (1 mM)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
50 ml Glycerin (10 %, wasserfrei)	3.4.1.15

3.4.2.2 Proteinbestimmung mit BCA-Kit

Diese Proteinbestimmungsmethode beruht darauf, dass BCA (Bicinchoninsäure) zusammen mit Cu^+ einen farbigen Komplex bildet. Cu^+ entsteht durch Reduktion von Cu^{2+} mittels des zu bestimmenden Proteins. Die Auswertung erfolgt photometrisch. Diese Methode macht jedoch die Aufnahme einer Eichkurve eines Proteins (z. B. Rinderserumalbumin) bekannter Konzentration zwingend erforderlich. Mithilfe dieser Eichkurve kann im weiteren Verlauf die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

Zur Durchführung:

Zunächst wurden die Proben 1:5 mit dest. H_2O verdünnt. Es folgte die Herstellung der Standards nach folgender Tabelle:

Tabelle 6 Übersicht des Standards zur Proteinbestimmung mit BCA-Kit

	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	H_2O (μl)	Protein-Standard (μl)
1	0	490	10
2	0,02	490	10
3	0,04	240	10
4	0,1	90	10
5	0,2	40	10
6	0,4	30	20
7	0,6	20	30
8	0,8	10	40
9	1	0	Stocklösung (1:1)

Die Stocklösung des Proteinstandards (2 mg/ml) wurde 1:1 mit dest. Wasser verdünnt, um 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erreichen. Je 10 μl Blank, Standards (Doppelansatz) und Proben (Dreifachansatz) wurden in die Mitte eines Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Es folgte die Herstellung der vorher berechneten erforderlichen Menge Proteinbestimmungsreagenz (1 Teil Reagenz B zu 50 Teilen Reagenz A). Pro Well wurden 200 μl dieses Reagenz hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte am Plattenreader bei 570 nm.

Materialienliste 18 Proteinbestimmung mit BCA-Kit

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
BCA Assay	Pierce [®] , Thermo Fisher Scientific, Bonn, D
Aqua dest.	hausinterne Anlage

3.4.2.3 Probenvorbereitung SDS-Gelelektrophorese

Auf Basis der Proteinbestimmung mittels BCA (3.4.2.2) wurde die benötigte Probenmenge berechnet (pro Geltasche 25 µg Protein). Daraufhin wurden die Proben in benötigter Menge dest. H₂O angesetzt und 5 µl Lämmli-Puffer zugefügt. Die fertig pipettierten Proben wurden anschließend kurz zentrifugiert und bei 95 °C für 10 min im Thermomixer (300 rpm) inkubiert. Auf diese Art und Weise werden Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken werden durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol aufgespalten (Lottspeich und Engels, 2012). Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und waren bereit zur Gelelektrophorese, bzw. konnten an dieser Stelle weggefroren werden (-20 °C).

Materialienliste 19 Probenvorbereitung SDS-Gelelektrophorese

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
Aqua dest.	hausinterne Anlage
Tris	AppliChem, Darmstadt, D
HCl	Sigma, Taufkirchen, D
<u>Lämmli-Puffer (5 x)</u>	
2 ml Tris HCl 0,625 M pH = 6,8 (20 %)	
1g SDS (10 %)	AppliChem, Darmstadt, D
5 ml Glycerin (50 %)	Ebenda
0,5 ml β-Mercaptoethanol (5 %)	Apotheke, Universitätsmedizin Rostock, D
0,5 ml Bromphenolblau (5 %, 1 % in EtOH)	Sigma, Taufkirchen, D
2 ml Aqua ad iniectabilia (20 %)	3.4.1.7

3.4.2.4 Gießen der SDS-Gele

Entsprechend der Anzahl der zu gießenden Gele wurden die Chemikalien im richtigen Verhältnis bis auf TEMED und APS, welche die Polymerisation starten, bei Trenn- und Sammelgel zusammen pipettiert. Das pipettierte Sammelgel wurde zur Seite gestellt (dunkel). Dem Trenngel wurde die entsprechende Menge TEMED und APS zugegeben und das Gefäß geschwenkt, um punktuellen Auspolymerisieren zu verhindern. Mit einer serologischen Pipette (10 ml) wurde das noch flüssige Gel vorsichtig in die vorbereiteten Gelkammern gegeben. Anschließend wurden 300 - 400 µl Isopropanol auf die Gele pipettiert, um während des Polymerisationsvorganges das Austrocknen der Gele zu vermeiden. Nach mindestens 30 min und maximal 2 - 3 h wurde dem Sammelgel TEMED und APS zugegeben. Dieses wurde mit einer serologischen Pipette (5 ml) – nach dem Entfernen des restlichen Isopropanols mittels Filterpapier – auf das Trenngel gegeben. Die Kämme zur Bildung der Geltaschen wurden eingesetzt. Es folgte ein weiterer Polymerisationsschritt. Nach mindestens 30 min und maximal 2 - 3 h wurden die Gele aus den Halterungen genommen und in feuchten Tüchern verpackt im Kühlschrank gelagert (max. 4 Wochen). Die Gele wurden nach dem Gießen zur Polymerisation mindestens eine Nacht im Kühlschrank gelagert, bevor die Gelelektrophorese gestartet wurde.

Tabelle 7 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS-Gelelektrophorese bei einem Ansatz von 8 Gelen

8 Gele, 1,5 mm, 10 % SDS	Chemikalie	Menge
Trenngel	H ₂ O	24,3 ml
	1,5 M Tris-HCl pH = 8,8	15 ml
	SDS (10 %)	0,6 ml
	Acryl-/Bis-Acrylamid	19,8 ml
	TEMED	30 µl
	APS (10 %)	300 µl
Sammelgel	H ₂ O	18,3 ml
	0,5 M Tris-HCl pH = 6,8	7,5 ml
	SDS (10 %)	0,3 ml
	Acryl-/Bis-Acrylamid	4,02 ml
	TEMED	30 µl
	APS (10 %)	150 µl

Materialienliste 20 Gießen der SDS-Gele

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
Aqua ad iniectabilia	3.4.1.7
APS (10 %)	Carl Roth GmbH, München, D
SDS (10 %)	AppliChem, Darmstadt, D
5 g auf 50 ml Aqua ad iniectabilia	ebenda D
<u>500 mM Tris-HCl</u>	
500 mM Tris Base (30,3 g)	ebenda
auf 400 ml mit Aqua ad iniectabilia auffüllen	
~ 20 ml HCl (pH = 6,8)	Sigma, Taufkirchen, D
→ mit Aqua ad iniectabilia auf 500 ml auffüllen	
<u>1500 mM Tris-HCl</u>	
1500 mM Tris Base (181,7 g)	AppliChem, Darmstadt, D
auf 800 ml mit Aqua ad iniectabilia auffüllen	
~ 35 ml HCl (pH = 8,8)	Sigma, Taufkirchen, D
→ mit Aqua ad iniectabilia auf 1000 ml auffüllen	
TEMED	Carl Roth GmbH, München, D
Acryl-/Bis-Acrylamid (Rotiphorese [®])	ebenda
Gel 30)	
dest. H ₂ O	hausinterne Anlage

3.4.2.5 SDS-Gelelektrophorese

Elektrophorese bezeichnet die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Die Auftrennung eines Substanzgemisches basiert auf unterschiedlicher elektrophoretischer Bewegungen der Teilchen je nach Größe und Ladung. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladung von Proteinen überdeckt.

Zur Durchführung:

Die Gele wurden in die Gelkammern gesetzt und diese mit Ladepuffer aufgefüllt. Die vorbereiteten Proben wurden in die Gelkammern gegeben. 3 µl Standard wurde ebenfalls in eine Tasche/Gel gegeben. Die Kammern wurden geschlossen. Der Lauf begann mit 15 mA/Gel. Kurz bevor die Laufront das Gel vollständig passierte, wurde die Gelelektrophorese gestoppt. Es folgte der Western Blot.

Materialienliste 21 SDS-Gelelektrophorese

Material	Vertrieb
Proteinstandard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<u>Laufpuffer:</u> 100 ml Stammlösung Laufpuffer 10 x 900 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage
<u>Laufpuffer 10 x:</u> 250 mM Tris Base (30,3 g) 1920 mM Glycin (144,1 g) auf 1000 ml mit Aqua dest iniectabilia auffüllen	AppliChem GmbH, Darmstadt, D ebenda 3.4.1.7
1 % SDS (10 g) (keine pH-Wert Einstellung)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

3.4.2.6 Western Blot

Unter Western Blotting versteht man ein Verfahren, mit dem elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran aus Nitrozellulose unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes transferiert und immobilisiert werden können. Der Nachweis erfolgt direkt, mit spezifischen Bindungseigenschaften, über Antikörper, Lektine oder Enzymsubstrate (Lottspeich und Engels, 2012).

Zur Durchführung:

Unter dem Abzug wurde eine Plastewanne mit Blot-Puffer gefüllt. Darin wurde die Blotkammer aufgebaut, d. h. pro Sandwichklammer zunächst ein Schwamm, dann ein Filterpapier, darauf das Gel (ohne Sammelgel), darauf die beschriftete Membran, gefolgt von einem Filterpapier und einem Schwamm. Es wurde möglichst blasenfrei gearbeitet. Die schwarze Seite der Sandwichklammer war „unten“, die weiße Seite „oben“. Die Sandwichklammer wurde in die Blotkammer (entsprechen der Laufrichtung des Stroms, d. h. die schwarze Seite der Sandwichklammer zeigte zur schwarzen Seite der Blotkammer) gesetzt. Nachdem ein Kühlakku eingesetzt und die Kammer mit Blot-Puffer gefüllt wurde, startete der Blotlauf mit 200 mA/Gel für 130 min.

Materialienliste 22 Western Blot

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
<u>Blot-Puffer:</u>	
100 ml Blot-Puffer 10 x	
700 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage
200 ml Methanol	Apotheke, Universitätsmedizin Rostock, D
<u>Blot-Puffer 10 x:</u>	
250 mM Tris Base (30,3 g)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
1920 mM Glycin (144,1 g)	ebenda
auf 1000 ml mit Aqua ad iniectabilia auffüllen	3.4.1.7
0,5 % SDS (5 g) (keine pH-Wert Einstellung)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

3.4.2.7 Auswertung der Membranen mittels ChemiDoc

Zur Auswertung der Membranen mittels ChemiDoc ist zunächst eine Behandlung mit unterschiedlichen Antikörpern nötig. Sämtliche in der Durchführung beschriebene Blockierungs-, Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf dem Rollmixer. Zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes wurden die Membranen zunächst 1 h mit 5 % Milchpulver (in TBS-T) (5 ml/Membran) blockiert. Es folgte ein Waschschrift (3 x für 7 min mit TBS-T, 5 ml/Membran). Dieser Waschschrift entfiel bei einem Primärantikörper gelöst in 5 % Milchpulver. Dieser Primärantikörper wurde entsprechend in TBS-T mit Milchpulver verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert (3 ml/Membran). Als Ladekontrolle wurde ein β -Aktin Antikörper verwendet. Es folgte ein Waschschrift (ebenda). Der Sekundärantikörper wurde entsprechend in TBS-T mit Milchpulver verdünnt und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (3 ml/Membran). Darauf folgte ein Waschschrift (ebenda). Im Anschluss erfolgte die Auswertung am ChemiDoc, d. h. die Antikörperbindung wurde mittels einer Chemilumineszenzlösung (ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1, 1,5 ml/Membran) visualisiert. Die densitometrische Analyse der Bandenintensitäten wurde mithilfe der ChemiDoc Software Quantity One 1-D durchgeführt. Die Membranen wurden nach der Behandlung mit der Chemilumineszenzlösung gestrippt und im Anschluss konnten nach erneuter Blockierung mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert werden.

Materialienliste 23 Auswertung der Membranen mittels ChemiDoc

<i>Material</i>	<i>Vertrieb</i>
Tris	3.4.2.3
HCl	Ebenda
phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) Antikörper → 1:1000 in 5 % Milchpulver	Cell Signalling, Leiden, Niederlande
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antikörper → 1:1000 in 5 % Milchpulver	Ebenda
FAAH-Antikörper → 1:500 in 1 % Milchpulver	Abcam, Cambridge, UK
β-Aktin-Antikörper → 1:10 000 in 1 % Milchpulver	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-Maus Antikörper → 1:1000 in 1 % Milchpulver	Cell Signalling, Leiden, Niederlande
Anti-Hase IgG Antikörper → 1:1000 in 5 % Milchpulver	ebenda
<u>TBS-T:</u>	
100 ml Stammlösung	
900 ml Aqua dest.	hausinterne Anlage
1 ml Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
<u>TBS 10 x:</u>	
121,1 g 1000 mM Tris Base	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
87,7 g 1500 mM NaCl	ebenda
800 ml Aqua ad iniectabilia	3.4.1.7
~ 60 ml HCl (pH = 7,5)	Sigma, Taufkirchen, D
→ mit Aqua ad iniectabilia auf 1000 ml	3.4.1.7
<u>5 % Milchpulver:</u>	
200 ml TBS-T	
10 g Milchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<u>ECL-Lösung 1:</u>	
2,5 mM Luminol (500 µl)	Sigma, Taufkirchen, D
400 µM p-Coumarsäure (220 µl)	ebenda
100 mM Tris HCl (pH = 8,5) (5 ml)	mit Aqua ad iniectabilia auf 50 ml auffüllen
<u>ECL-Lösung 2:</u>	
Wasserstoffperoxid (300 µl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
100 mM Tris HCl (pH = 8,5) (5 ml)	
→ mit Aqua ad iniectabilia auf 50 ml	3.4.1.7
<u>Strippuffer</u>	
5 x Stocklösung 1:5 verdünnen (Aqua dest.)	hausinterne Anlage
<u>Strippuffer 5x</u>	
1000 mM Glycin (75,1 g)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
2500 mM NaCl (146,1 g)	Applihem GmbH, Darmstadt,
→ mit Aqua ad iniectabilia auf 800 ml	3.4.1.7
~ 20 ml HCl (pH = 2,5)	Sigma, Taufkirchen, D
→ mit Aqua ad iniectabilia auf 1000 ml	3.4.1.7

3.4.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte entweder via t-Test (*two-tailed*, 2-seitig) oder ANOVA (mit post hoc Bonferroni- oder Dunnett-Test). Als Software wurde GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) verwendet. Es wurden unabhängige Gruppen verglichen. Die Normalverteilung wurde vorausgesetzt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Nachweis für die Induktion der Migration von mesenchymalen Stammzellen durch FAAH-Inhibitoren, Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen erbracht. Als zugrunde liegender Signalweg konnte die Phosphorylierung der p42/44 MAPK gefolgt von einer PPAR α -Aktivierung ermittelt werden.

4.1 Kultivierung von ADSCs

Die in dieser Arbeit verwendeten adulten humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (ADSCs) wurden am Tag der Liposuktion oder maximal 24 h später isoliert (3.4.1.1). 20 bis 24 h nach Isolierung erfolgte die CD34⁺-Trennung (3.4.1.2; Abb. 5), d. h. die Umsetzung der CD34⁺-Zellen von Passage 0 (P0) in P1. Zu diesem Zeitpunkt waren zahlreiche Erythrozyten zu sehen. Am Ende der CD34⁺-Trennung waren diese nahezu vollständig entfernt worden. Die Zellen blieben maximal fünf Tage in einer Passage und zeigten bis zum Ende der Kultivierung eine für diese typische fibroblastoide Morphologie (Abb. 6).

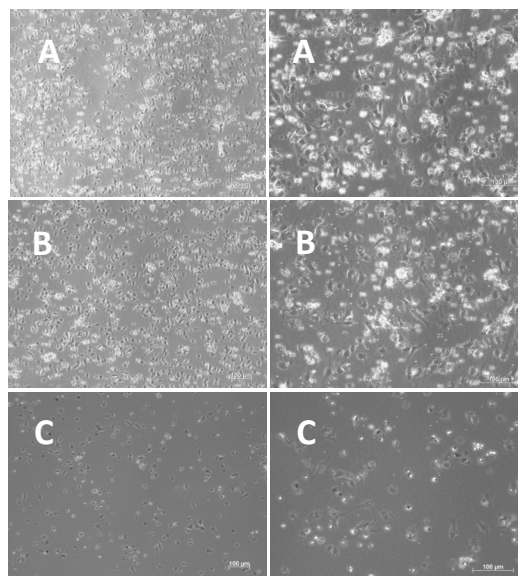


Abb. 5 Exemplarische Darstellung der CD34⁺-Trennung in 100- und 200-facher Vergrößerung (links bzw. rechts). Dargestellt ist der Verlauf der CD34⁺-Trennung beginnend vor der Trennung und nach dem Waschen (A). Anschließend erfolgte die mikroskopische Begutachtung der Zellen und die Zugabe der entsprechenden Menge Beads (B) (ideal: 3 - 4 Beads pro Zelle). 24 h später, nach dem ersten Mediumwechsel (C), war deutlich zu erkennen, dass artfremde Zellen wie z. B. Erythrozyten entfernt wurden.

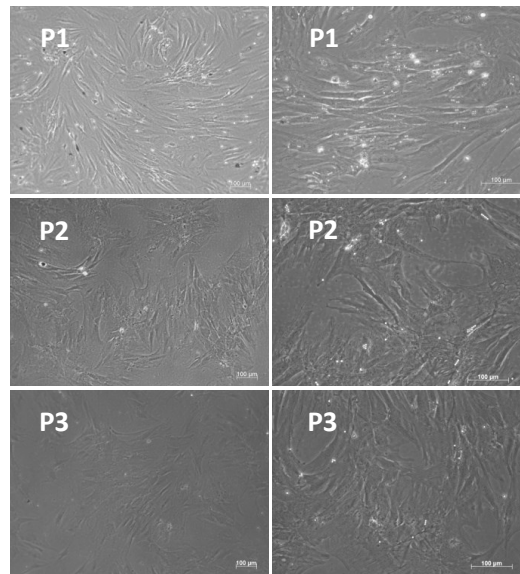


Abb. 6 Exemplarischer Kulturverlauf von ADSCs eines Donors in Passage 1 bis 3 (P1-3) in 100- und 200-facher Vergrößerung (links bzw. rechts). Die in dieser Arbeit verwendeten ADSCs waren maximal fünf Tage in einer Passage und behielten bis zum Ende der Kultivierung ihre fibroblastoide Morphologie bei.

4.2 Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Migration von ADSCs

4.2.1 Scratch-Assay

Da der Einfluss der FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT auf das Migrationsverhalten von ADSCs unbekannt war, wurde zunächst als Vorversuch ein Wundheilungstest, d. h. ein Scratch-Assay, durchgeführt (Abb. 7). Dazu wurden in einen konfluenten ADSC-Zellrasen eines Donors Risse gesetzt und deren Heilungsprozess unter Einfluss von FAAH-Inhibitoren verfolgt. Die ADSCs wurden 24 h mit 10 μ M URB597 bzw. 12 h mit 10 μ M AA-5HT inkubiert. Vor Beginn und am Ende der Inkubation wurden die gesetzten Risse dokumentiert (Abb. 7). Als Kontrolle dienten ADSCs behandelt mit Vehikel. Es konnte ein promigratorischer Effekt von URB597 und AA-5HT beobachtet werden.

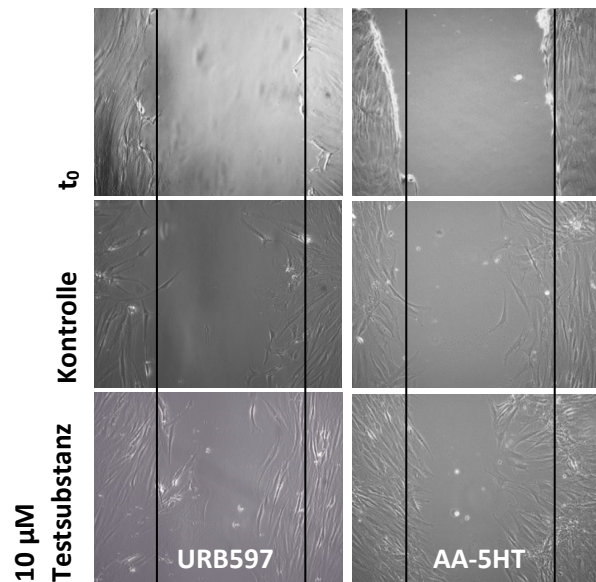


Abb. 7 Scratch-Assay zur Untersuchung des promigratorischen Effekts von URB597 und AA-5HT. Zur Ermittlung des promigratorischen Effekts wurden Risse in einen konfluenten ADSC-Zellrasen eingebracht und deren Heilungsprozess unter Einfluss von FAAH-Inhibitoren untersucht. Die ADSCs eines Donors wurden 24 h mit URB597 und 12 h mit AA-5HT (jeweils 10 µM) inkubiert. Zum Zeitpunkt t_0 wurde der Zustand der unbehandelten Risse dokumentiert. Diese wurden ebenso am Ende der Inkubationsphase fotografisch festgehalten. Als Kontrolle diente Vehikel

4.2.2 Kinetik der promigratorischen Wirkung im Boyden-Kammer-Versuch

Der durch den Scratch-Assay beobachtete promigratorische Effekt der FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT konnte durch Boyden-Kammer-Versuche bestätigt werden (Abb. 8). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass dieser promigratorische Effekt zeitabhängig ist. ADSCs wurden 15, 60, 120 und 360 min mit 10 µM URB597 bzw. AA-5HT inkubiert. Im Vergleich zur korrespondierenden Vehikelkontrolle zeigte URB597 nach 120 min einen signifikanten Anstieg der Migration. Der FAAH-Inhibitor AA-5HT zeigte bereits nach 60 min einen signifikanten promigratorischen Effekt.

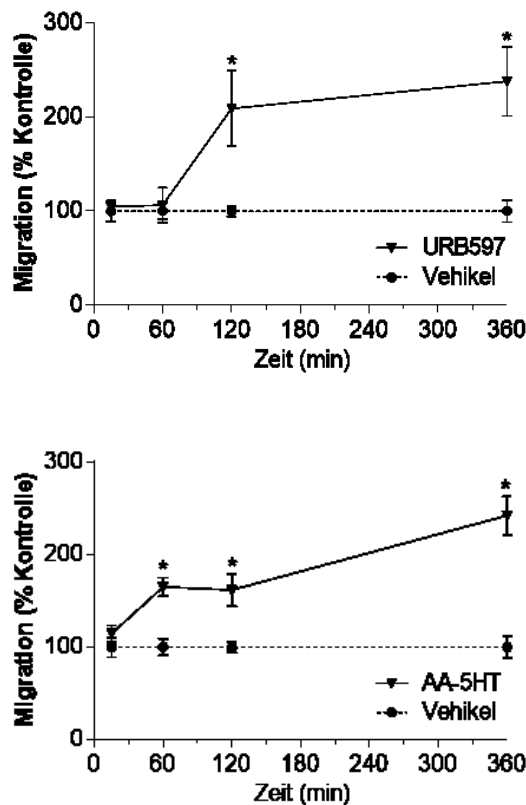


Abb. 8 Zeitabhängiger Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Migration von ADSCs. Zur Ermittlung des zeitabhängigen Migrationsverhaltens von ADSCs unter Einfluss der FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT (jeweils 10 μ M) wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. ADSCs wurden 15, 60, 120 oder 360 min mit Vehikel, URB597 oder AA-5HT inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) eines Donors ($n = 3 - 4$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. * $P < 0,05$

4.2.3 Konzentrationsabhängigkeit der promigratorischen Wirkung im Boyden-Kammer-Versuch

Neben dem Faktor Zeit wurde auch untersucht, welchen Einfluss die Konzentration der FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT auf die Migration von ADSCs hat (Abb. 9). Es konnte nachgewiesen werden, dass der promigratorische Effekt konzentrationsabhängig ist. ADSCs wurden 6 h mit URB597 bzw. AA-5HT entsprechender Konzentration inkubiert. Im Vergleich zur korrespondierenden Vehikelkontrolle zeigten die URB597-Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M einen signifikanten Anstieg der Migration. Der FAAH-Inhibitor AA-5HT zeigte bei einer Konzentration von 10 μ M einen signifikanten promigratorischen Effekt.

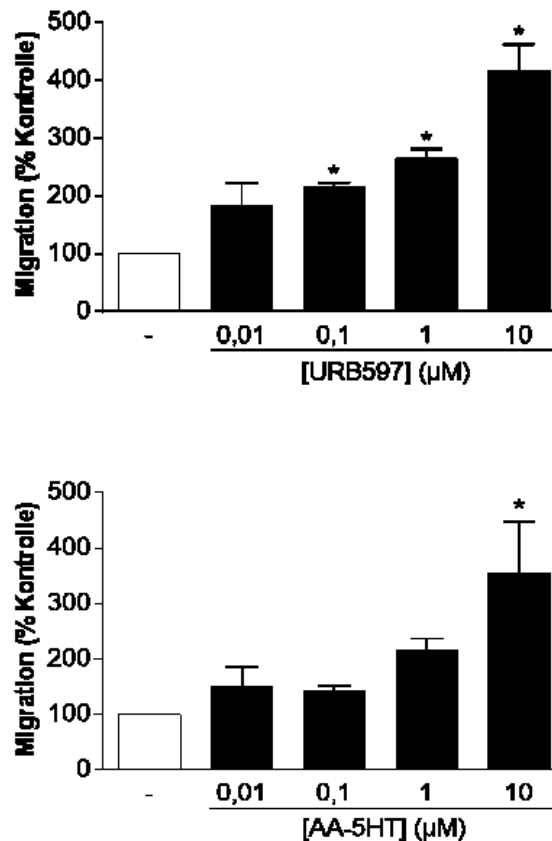


Abb. 9 Konzentrationsabhängiger Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Migration von ADSCs. Zur Ermittlung des Migrationsverhaltens von ADSCs unter Einfluss der FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. ADSCs wurden 6 h mit Vehikel, URB597 oder AA-5HT inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren (Vehikel, 1 μ M, 10 μ M $n = 6 - 7$) bzw. einem Donor (Vehikel, 0,01 μ M, 0,1 μ M). Aufgrund der unterschiedlichen Vehikelkontrollen bei der statistischen Evaluierung der Experimente wurden diese ohne SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test. * $P < 0,05$

4.3 Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Viabilität von ADSCs

Um auszuschließen, dass die gesteigerte Migration von ADSCs durch URB597 bzw. AA-5HT das Ergebnis eines unspezifischen Effektes bedingt durch erhöhte Viabilität der Zellen war, wurden WST-1-Tests mit analogem Behandlungsschema durchgeführt. Es zeigte sich, dass die FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT die Viabilität tendenziell eher erniedrigten. Die entsprechenden Viabilitäten fielen dabei jedoch nicht unter Werte von ca. 85 % gegenüber der Vehikelkontrolle (Tabelle 8).

Tabelle 8 Analyse der zellulären Viabilität von ADSCs behandelt mit den FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT. ADSCs wurden 6 h mit Vehikel (Konzentration "0" μM) oder der angegebenen Konzentration der Testsubstanz in serumfreien ADSC-Expansionsmedium inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mittels WST-1-Test bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 30$ (URB597, 5 Donoren) und $n = 24$ (AA-5HT, 4 Donoren) Experimenten. * $P < 0,05$ vs. korrespondierende Vehikelkontrolle (100 %), 1-way ANOVA (post hoc Dunnett Test).

<i>Konzentration (μM)</i>	<i>Viabilität (%)</i>	
	URB597	AA-5HT
0	100,0 \pm 1,2	100,0 \pm 1,6
0,1	86,7 \pm 1,7 *	91,2 \pm 3,2 *
1	87,4 \pm 1,6 *	89,8 \pm 2,9 *
10	91,0 \pm 1,6 *	88,7 \pm 2,5 *

4.4 Rolle der p42/44 MAPK bei der promigratorischen Wirkung von FAAH-Inhibitoren

4.5 Kinetik der MAPK-Aktivierung durch FAAH-Inhibitoren

Erst kürzlich konnte demonstriert werden, dass die Aktivierung der p42/44 MAPK eine zentrale Rolle bei der Migration von ADSCs spielt (Schmuhl et al., 2014). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden URB597 und AA-5HT via Western Blot hinsichtlich p42/44-MAPK-Aktivierung untersucht. Beide FAAH-Inhibitoren zeigten eine zeitabhängige Aktivierung der p42/44-Signalkaskade. Im Vergleich zur korrespondierenden Vehikelkontrolle riefen beide FAAH-Inhibitoren einen signifikanten Anstieg der p42/44-MAPK-Aktivierung, URB597 nach 120 min (Abb. 10) und AA-5HT bereits nach 30 min, hervor (Abb. 11).

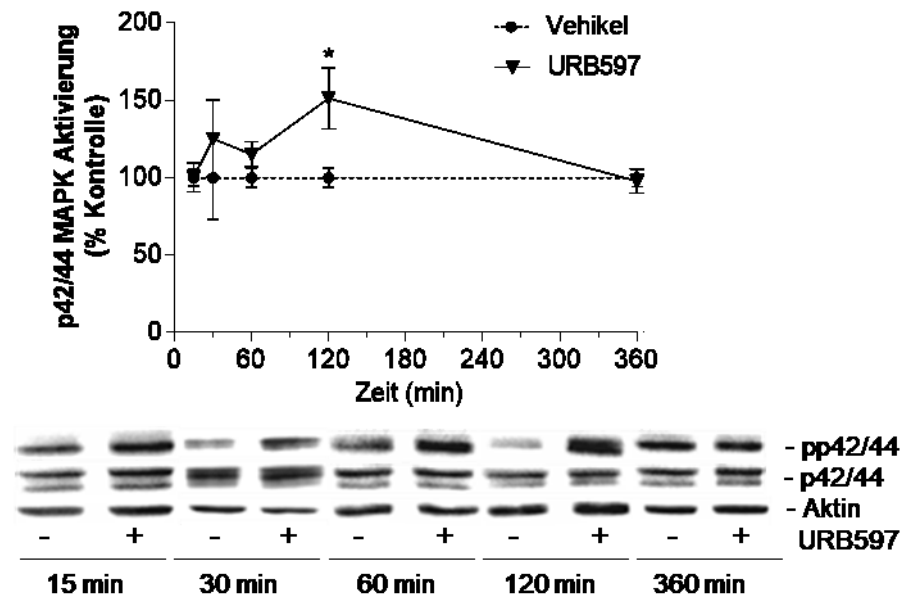


Abb. 10 Kinetik der URB597-bedingten Aktivierung der p42/44 MAPK. Zur Ermittlung der zeitabhängigen p42/44-MAPK-Aktivierung unter Einfluss von URB597 wurden Western Blots durchgeführt. ADSCs wurden mit Vehikel oder 10 μ M URB597 entsprechend den gewählten Zeiträumen inkubiert. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von fünf Donoren ($n = 15$, 15 min und 360 min), drei Donoren ($n = 9$, 30 min) bzw. sieben Donoren ($n = 21$, 60 min und 120 min). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. * $P < 0,05$

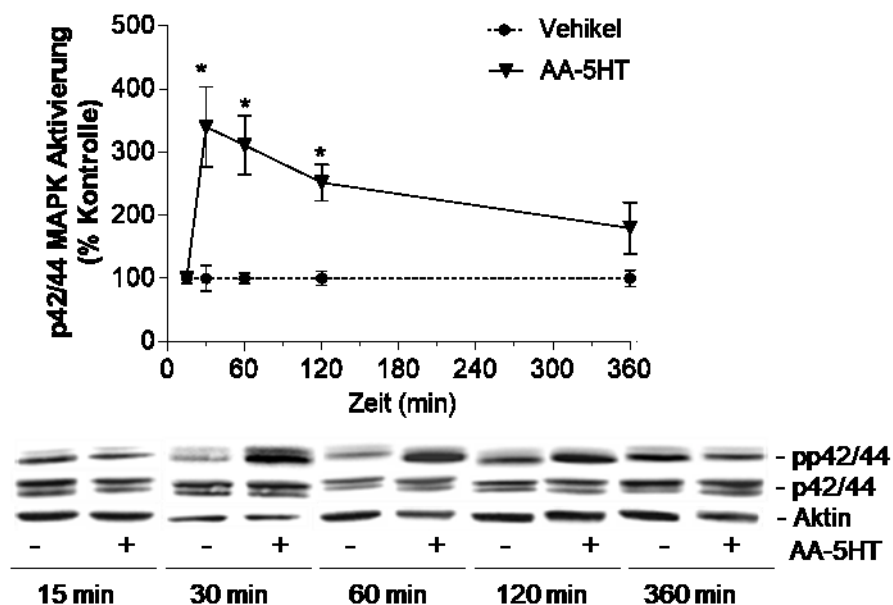


Abb. 11 Kinetik der AA-5HT-bedingten Aktivierung der p42/44 MAPK. Zur Ermittlung der zeitabhängigen p42/44-MAPK-Aktivierung unter Einfluss von AA-5HT wurden Western Blots durchgeführt. ADSCs wurden mit Vehikel oder 10 μ M AA-5HT entsprechend den gewählten Zeiträumen inkubiert. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren ($n = 6$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. * $P < 0,05$

4.5.1 Konzentrationsabhängigkeit der MAPK-Aktivierung durch FAAH-Inhibitoren

Neben dem Faktor Zeit wurde auch untersucht, welchen Einfluss die Konzentration der FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT auf die Aktivierung der p42/44-Signalkaskade hat (Abb. 12; Abb. 13). Es konnte nachgewiesen werden, dass der p42/44-MAPK-aktivierende Effekt von URB597 und AA-5HT konzentrationsabhängig ist. ADSCs wurden 2 h mit URB597 bzw. 1 h mit AA-5HT entsprechender Konzentration inkubiert. Im Vergleich zur korrespondierenden Vehikelkontrolle zeigte die URB597- und AA-5HT-Konzentration von 10 μM einen signifikanten Anstieg der Aktivierung von p42/44 MAPK.

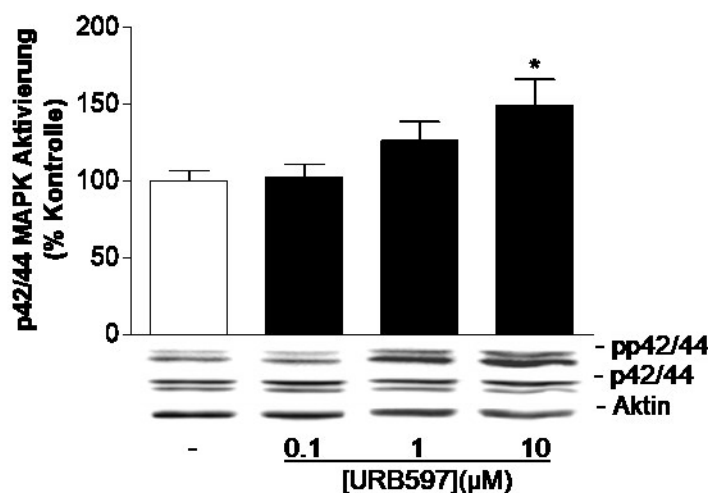


Abb. 12 Konzentrationsabhängiger Einfluss von URB597 auf die p42/44-MAPK-Aktivierung. Zur Ermittlung des konzentrationsabhängigen Effektes von URB597 auf die p42/44-MAPK-Aktivierung wurden Western Blots durchgeführt. ADSCs wurden 2 h mit Vehikel oder URB597 entsprechender Konzentration inkubiert. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren ($n = 6$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test. * $P < 0,05$

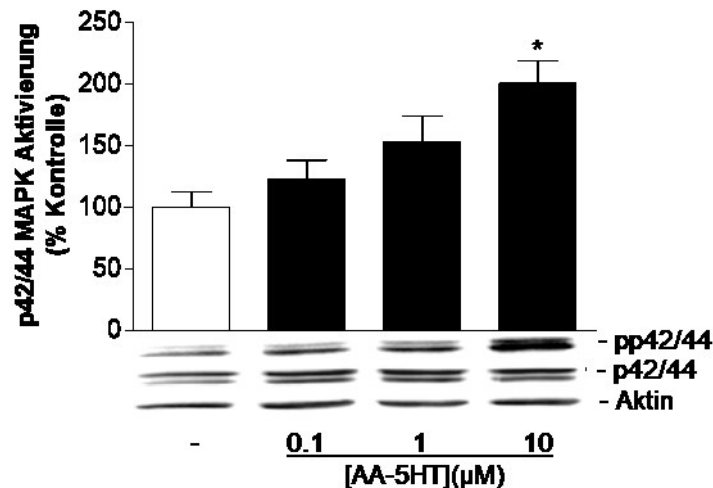


Abb. 13 Konzentrationsabhängiger Einfluss von AA-5HT auf die p42/44-MAPK-Aktivierung. Zur Ermittlung des konzentrationsabhängigen Effektes von AA-5HT auf die p42/44-MAPK-Aktivierung wurden Western Blots durchgeführt. ADSCs wurden 1 h mit Vehikel oder AA-5HT entsprechender Konzentration inkubiert. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren ($n = 6$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test. * $P < 0,05$

4.5.2 Einfluss der p42/44-MAPK-Aktivierungshemmung auf die promigratorische Wirkung von FAAH-Inhibitoren

Um einen kausalen Zusammenhang zwischen MAPK-Aktivierung und URB597- bzw. AA-5HT-bedingter Migration zu demonstrieren, wurden Boyden-Kammer-Versuche mit PD98059, einem Inhibitor der p42/44-MAPK-Aktivierung, durchgeführt (Abb. 14). ADSCs wurden mit den FAAH-Inhibitoren URB597 bzw. AA-5HT (je 10 μ M) inkubiert, wobei einem Ansatz 10 μ M PD98059 zugegeben wurde. Eine Inhibierung der p42/44-MAPK-Aktivierung durch PD98059 ging einher mit einer signifikant verminderten Migration. Ein weiterer Inhibitor für das MAPK-System, SB203580, wurde als Negativkontrolle untersucht. SB203580, ein Inhibitor der p38 MAPK, hatte keinen Einfluss auf die URB597- bzw. AA-5HT-bedingte Migration (Abb. 14).

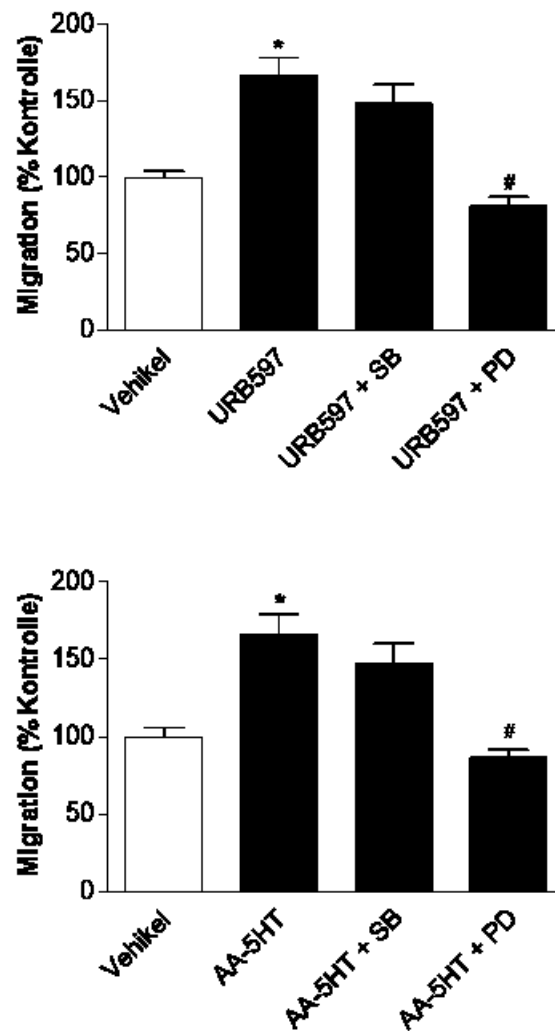


Abb. 14 Rolle der p42/44 MAPK bei der URB597- bzw. AA-5HT-bedingten Migration von ADSCs. Zur Untersuchung des FAAH-Inhibitor-bedingten promigratorischen Effekts in Anwesenheit eines p42/44-MAPK-Aktivierungs-Inhibitors (PD98059) und eines p38-MAPK-Inhibitors (SB203580) wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. ADSCs wurden 1 h mit PD98059 bzw. SB203580 präinkubiert (jeweils 10 μ M). Anschließend folgte eine 6-h-Inkubation mit URB597 bzw. AA-5HT (jeweils 10 μ M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von vier Donoren (n = 16). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. Testsubstanz

4.6 Rolle von CB₁, CB₂ und TRPV1 bei der FAAH-Inhibitor-bedingten Migration

Zum Nachweis einer möglichen Involvierung von Cannabinoidrezeptoren bzw. TRPV1 in die promigratorischen Effekte von URB597 und AA-5HT wurden Migrationsversuche durchgeführt, bei denen die Zellen vor der 6-h-Inkubation mit URB597 bzw. AA-5HT (je 10 μ M) für 1 h mit Antagonisten für CB₁, CB₂ und TRPV1 präinkubiert wurden (Tabelle 9). Für einen Rezeptorantagonismus hat sich eine Konzentration von 1 μ M als ausreichend erwiesen (Ramer und Hinz, 2008; Schmuhl et al., 2014). AM-251, ein CB₁-Antagonist, führte zu keiner

signifikant verminderten Migration. AM-630 hingegen, ein CB₂-Antagonist, verminderte die URB597- bzw. AA-5HT-bedingte Migration signifikant. Dies lässt auf Involvierung des CB₂-Rezeptors in die URB597- bzw. AA-5HT-bedingte Migration schließen. Darüber hinaus führte die Kombination von AM-251 und AM-630, im Vergleich zum alleinigen Einsatz von AM-630, zu einer vollständigen Inhibierung der FAAH-Inhibitor-induzierten Migration von ADSCs. Bei Capsazepin handelt es sich um einen TRPV1-Antagonisten. Dieser führt zu einer signifikant verminderten Migration beider FAAH-Inhibitoren (Tabelle 9). In Übereinstimmung mit Literaturangaben (Schmuhl et al., 2014) führte Capsazepin allein zu einer Inhibition der basalen Migration.

Tabelle 9 Rolle von CB₁, CB₂ und TRPV1 bei der URB597- bzw. AA-5HT-bedingten Migration. ADSCs wurden 1 h mit AM-251 (CB₁-Antagonist), AM-630 (CB₂-Antagonist) oder Capsazepin (Capsa, TRPV1-Antagonist) mit einer Konzentration von 1 µM präinkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von URB597 bzw. AA-5HT (10 µM) und eine weitere Inkubation von 6 h. Als Kontrolle diente Vehikel. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor (n = 3 - 4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. jeweiligen FAAH-Hemmer; n.s. (nicht signifikant)

	<i>Migration (% Kontrolle)</i>
Vehicle	100,0 ± 21,1
URB597	414,3 ± 27,0 *
URB597 + AM-251	312,0 ± 43,0 n.s.
URB597 + AM-630	151,7 ± 20,3 #
URB597 + AM-251 + AM-630	118,3 ± 12,4 #
Vehicle	100,0 ± 20,0
AA-5HT	599,3 ± 35,3 *
AA-5HT + AM-251	486,7 ± 40,7 n.s.
AA-5HT + AM-630	272,7 ± 32,1 #
AA-5HT + AM-251 + AM-630	92,7 ± 13,7 #
Vehicle	100,0 ± 5,8
URB597	335,5 ± 56,4 *
URB597 + Capsa	51,3 ± 13,1 #
AA-5HT	454,5 ± 80,2 *
AA-5HT + Capsa	44,0 ± 13,6 #
Capsa	68,0 ± 4,0

4.7 Nachweis der Effizienz der FAAH-Inhibitoren mittels LC-MS

Zur Bestätigung, dass eine Inhibition der FAAH zu der Akkumulation von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen führt, wurden LC-MS-Analysen durchgeführt (Abb. 15). Dazu wurden ADSCs 6 h mit jeweils 10 µM URB597 bzw. AA-5HT inkubiert und anschließend hinsichtlich FAAH-Substraten (AEA, 2-AG, OEA, PEA) analysiert (Abb. 15). Die intrazelluläre

Konzentration sämtlicher FAAH-Substrate stieg durch FAAH-Inhibierung im Vergleich zur Vehikelkontrolle deutlich an. Eine Inhibierung via AA-5HT (3 Donoren) führte insbesondere zu einer starken AEA-Akkumulation, wohingegen eine Inhibierung via URB597 (4 Donoren) eher zu einer starken Akkumulation von Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen (OEA, PEA) führte. URB597 führte hinsichtlich 2-AG, welches hauptsächlich durch MAGL abgebaut wird, zu einer vergleichsweise geringen Akkumulation (Abb. 15). Eine ungewollte Isomerisierung von 2-AG wurde durch die gewählte experimentelle Durchführung der Extraktion und HPLC minimiert (Ivanov et al., 2015). Zusammenfassend spricht die durchgeführte LC-MS-Analyse dafür, dass FAAH-Inhibitoren in unserem experimentellen System zu einer Hemmung der Degradation von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen führen.

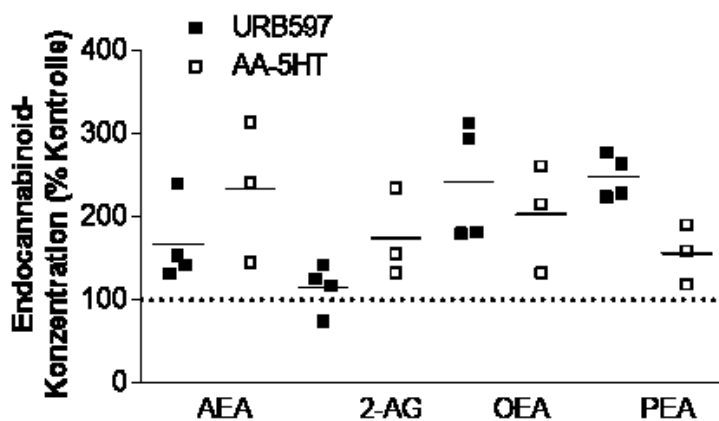


Abb. 15 LC-MS-Analyse des intrazellulären Gehalts an Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen nach FAAH Inhibierung. ADSCs wurden 6 h mit 10 μ M des jeweiligen FAAH-Inhibitors (URB597 bzw. AA-5HT) inkubiert. Die Konzentration von intrazellulären FAAH-Substraten (AEA, 2-AG, OEA, PEA) aus Zelllysaten wurde mittels LC-MS quantifiziert. Alle Konzentrationen wurden auf die zelluläre Proteinmenge normalisiert. Die Angabe "% Kontrolle" bezieht sich auf die korrespondierende Vehikelkontrolle (100 %). Die Vehikelkontrollen der FAAH-Inhibitoren sind als gepunktete Linie im Scatter Dot Plot angedeutet. Zur Berechnung der Stimulation wurden die entsprechenden Vehikelkontrollen von URB597 (n = 4) bzw. AA-5HT (n = 3) verwendet. Die horizontale Linie im Scatter Dot Plot stellt den entsprechenden Mittelwert der einzelnen Experimente von vier (URB597) bzw. drei Donoren (AA-5HT) dar. Basale Konzentrationen der FAAH-Substrate, gemessen in Vehikel-behandelten Zellen, lagen bei $1,13 \pm 0,29$ pmol/mg Protein (AEA), $24,62 \pm 2,42$ pmol/mg Protein (2-AG), $6,20 \pm 1,37$ pmol/mg Protein (OEA) und $4,13 \pm 0,87$ pmol/mg Protein (PEA) (Mittelwerte \pm SEM von Einzelexperimenten von n = 4 Donoren).

4.8 Promigratorischer Effekt von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen

4.8.1 Scratch-Assay

Basierend auf den Ergebnissen der LC-MS-Analysen wurde ein potenzieller promigratorischer Effekt von exogen applizierten Endocannabinoiden bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen untersucht. Dazu wurde ein Scratch-Assay mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von AEA, 2-AG, OEA und PEA (1 μ M und 10 μ M) durchgeführt. Vor Beginn und am Ende der Inkubation wurden die gesetzten Risse dokumentiert (Abb. 16). Als Kontrolle dienten ADSCs behandelt mit Vehikel. Es konnte ein promigratorischer Effekt von allen Testsubstanzen beobachtet werden.

4.8.2 Konzentrationsabhängigkeit der promigratorischen Wirkung im Boyden-Kammer-Versuch

Der unter 4.7.1 beobachtete promigratorische Effekt der Endocannabinoide AEA und 2-AG sowie der Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen OEA und PEA konnte durch Boyden-Kammer-Versuche bestätigt werden (Abb. 17; Abb. 18). Dieser promigratorische Effekt ist konzentrationsabhängig. ADSCs wurden 6 h mit AEA oder 2-AG bzw. OEA oder PEA entsprechender Konzentration inkubiert. Im Vergleich zur korrespondierenden Vehikelkontrolle zeigten beide Endocannabinoide sowie die Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen bei den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M einen signifikanten Anstieg der Migration. OEA wirkte darüber hinaus auch bei 0,1 μ M promigrativ. Um einen kausalen Zusammenhang zwischen MAPK-Aktivierung und Endocannabinoid-bedingter Migration zu demonstrieren, wurde bei den Boyden-Kammer-Versuchen PD98059, ein Inhibitor für die p42/44-MAPK-Aktivierung, eingesetzt, welcher den promigratorischen Effekt der Endocannabinoide bzw. der Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen aufhob (Abb. 17; Abb. 18).

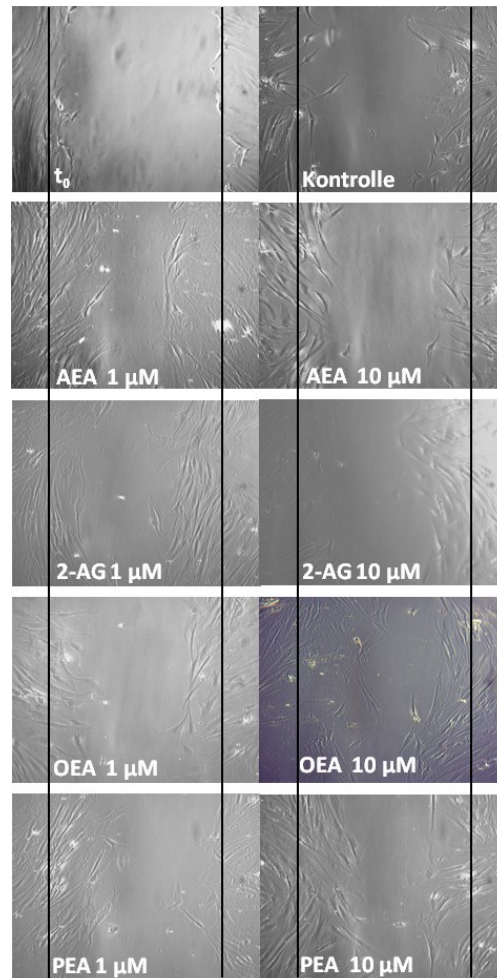


Abb. 16 Scratch-Assay zum Nachweis einer promigratorischen Wirkung von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen. Zur Ermittlung des promigratorischen Effekts wurden Risse in einen konfluenten ADSC-Zellrasen eingebracht und deren Heilungsprozess unter Einfluss von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen untersucht. Die ADSCs eines Donors wurden 24 h mit 1 μ M bzw. 10 μ M Endocannabinoid oder Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen inkubiert. Zum Zeitpunkt t_0 wurde der Zustand der unbehandelten Risse dokumentiert. Diese wurden ebenso am Ende der Inkubationsphase photographisch festgehalten. Als Kontrolle diente Vehikel

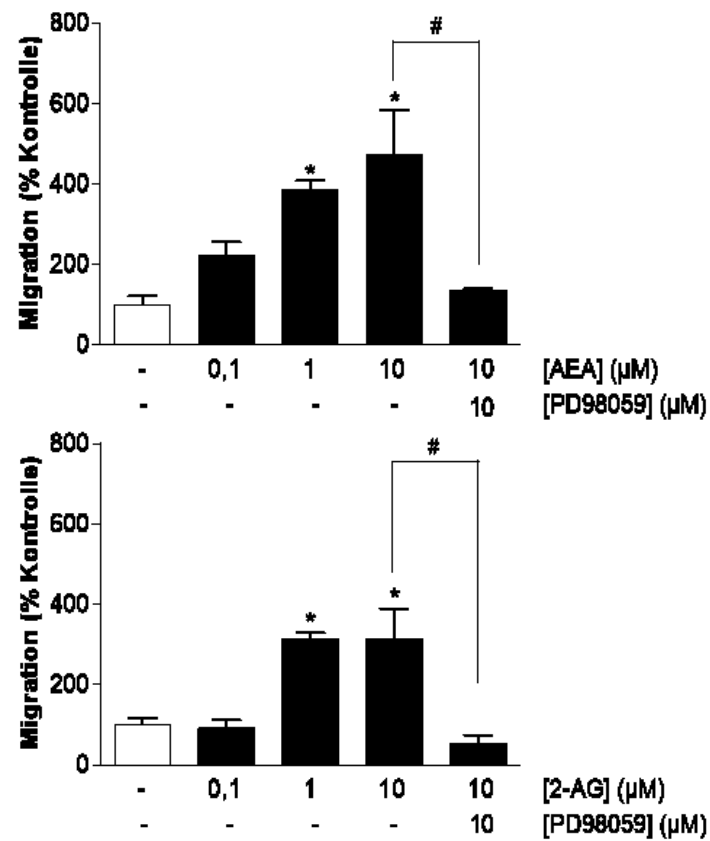


Abb. 17 Konzentrationsabhängiger promigratorischer Effekt von Endocannabinoiden auf ADSCs. Zur Untersuchung des konzentrationsabhängigen promigratorischen Effekts bedingt durch Endocannabinoide in Anwesenheit eines p42/44-MAPK-Aktivierungs-Blockers (PD98059) wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. ADSCs wurden 1 h mit PD98059 präinkubiert (jeweils 10 µM). Anschließend folgte eine 6-h-Inkubation mit AEA bzw. 2-AG entsprechender Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor ($n = 3$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. * $P < 0,05$ vs. Vehikelkontrolle; # $P < 0,05$ vs. Testsubstanz

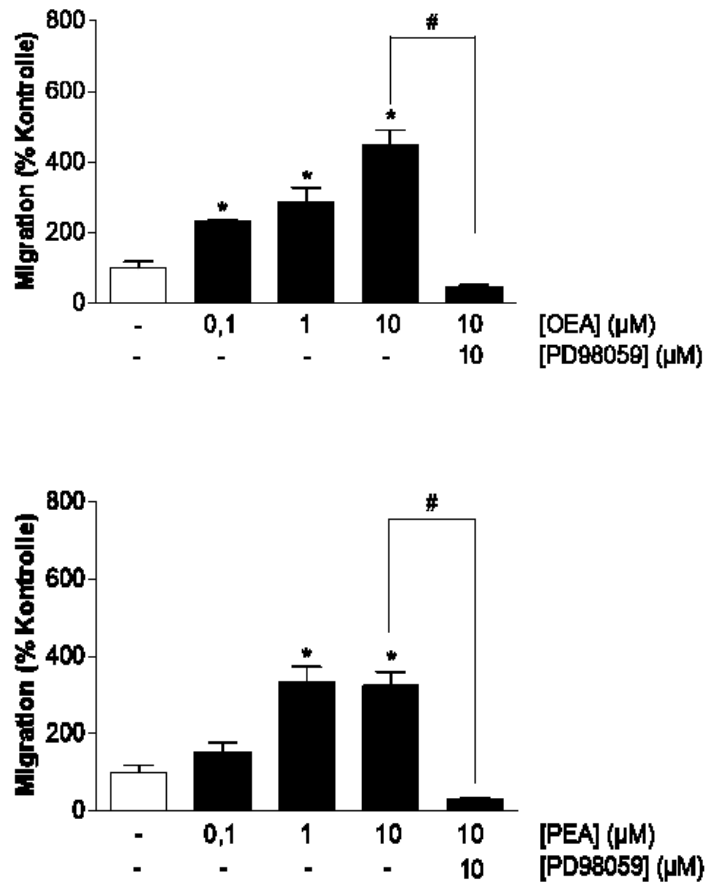


Abb. 18 Konzentrationsabhängiger promigratorischer Effekt von Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen auf ADSCs. Zur Untersuchung des konzentrationsabhängigen promigratorischen Effekts bedingt durch Endocannabinoid-ähnliche Substanzen in Anwesenheit eines p42/44-MAPK-Aktivierungs-Blockers (PD98059) wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. ADSCs wurden 1 h mit PD98059 präinkubiert (jeweils 10 μM). Anschließend folgte eine 6-h-Inkubation mit OEA bzw. PEA entsprechender Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor (n = 3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. Testsubstanz

4.9 Einfluss von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen auf die Viabilität von ADSCs

Um auszuschließen, dass die gesteigerte Migration von ADSCs durch Endocannabinoide bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen das Ergebnis eines unspezifischen Effekts bedingt durch erhöhte Viabilität der Zellen war, wurden WST-1-Tests mit analogem Behandlungsschema durchgeführt. Es zeigte sich, dass AEA, 2-AG, OEA bzw. PEA zu keiner signifikanten Änderung der Viabilität führen. Interessanterweise zeigten 2-AG und PEA in einer Konzentration von 10 μM einen minimalen Anstieg der Viabilität. Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch relevant (Tabelle 10).

Tabelle 10 Analyse der zellulären Viabilität von ADSCs behandelt mit Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen. ADSCs wurden 6 h mit Vehikel (Konzentration „0“ μM) oder der angegebenen Konzentration der Testsubstanz in serumfreien ADSC-Expansionsmedium inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mittels WST-1-Test bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 12$ (3 Donoren) Experimenten. n.s. (nicht signifikant) vs. korrespondierende Vehikelkontrolle (100 %), 1-Way ANOVA (post hoc Dunnett Test).

Konzentration (μM)	Viabilität (%)			
	AEA	2-AG	OEA	PEA
0	100,0 \pm 4,0	100,0 \pm 3,5	100,0 \pm 3,6	100,0 \pm 6,1
0,1	79,3 \pm 7,6 n.s.	93,6 \pm 9,7 n.s.	94,3 \pm 4,9 n.s.	93,2 \pm 6,3 n.s.
1	85,0 \pm 7,8 n.s.	95,4 \pm 7,9 n.s.	91,5 \pm 5,1 n.s.	99,9 \pm 5,6 n.s.
10	93,3 \pm 3,7 n.s.	126,9 \pm 9,0 n.s.	95,7 \pm 5,1 n.s.	115,7 \pm 4,3 n.s.

4.9.1 Konzentrationsabhängigkeit der MAPK-Aktivierung durch Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Boyden-Kammer-Versuche wurde ein Nachweis auf Proteinebene via Western Blot nach 2-h-Inkubation durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Migration durch Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen das Ergebnis erhöhter Aktivierung der p42/44-Signalkaskade ist. Alle getesteten Substanzen zeigten im Vergleich zur Vehikelkontrolle eine signifikante Erhöhung der p42/44-MAPK-Aktivierung bei einer Konzentration von 10 μM (Abb. 19; Abb. 20). Eine Konzentration von 1 μM Testsubstanz führte bei AEA (140 % \pm 18 %), OEA (150 % \pm 19 %) und PEA (138 % \pm 21 %) zu einer Erhöhung der Aktivität, dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. Die Aktivierung bedingt durch 2-AG erscheint als Schwellen (Threshold)-Effekt.

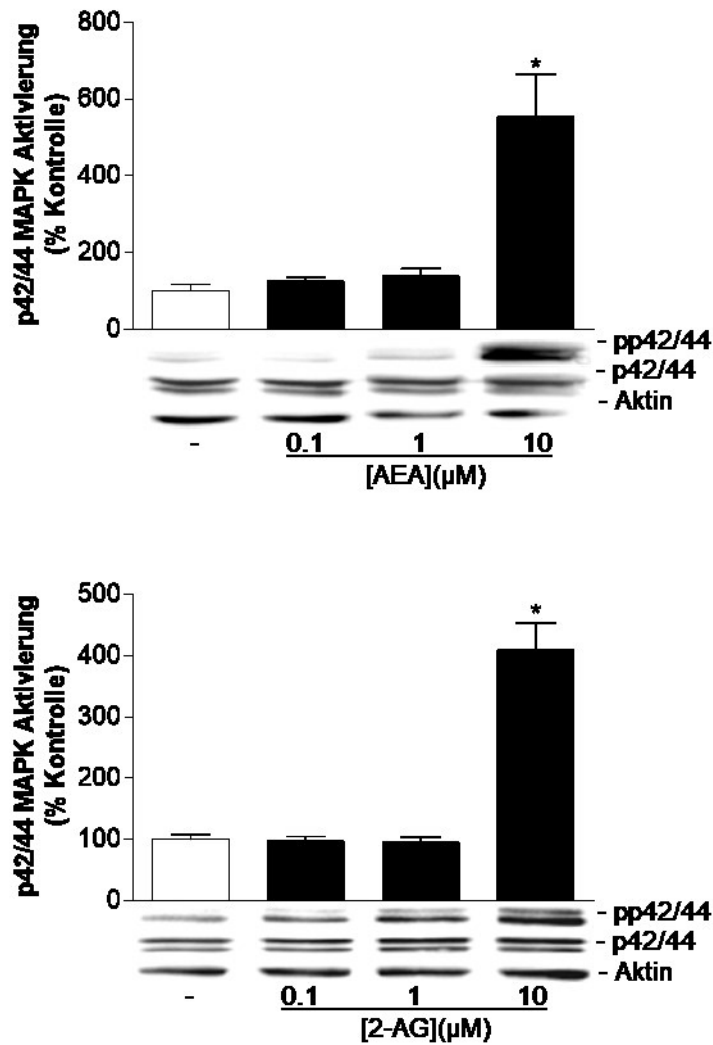


Abb. 19 Konzentrationsabhängige Aktivierung der p42/44 MAPK bedingt durch Endocannabinoide. Zur Ermittlung des konzentrationsabhängigen Effekts der Endocannabinoide auf die p42/44-MAPK-Aktivierung wurden Western Blots durchgeführt. ADSCs wurden 2 h mit Vehikel oder mit der Testsubstanz entsprechender Konzentration inkubiert. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren (AEA, $n = 6$) bzw. einem Donor (2-AG, $n = 3$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test. * $P < 0,05$

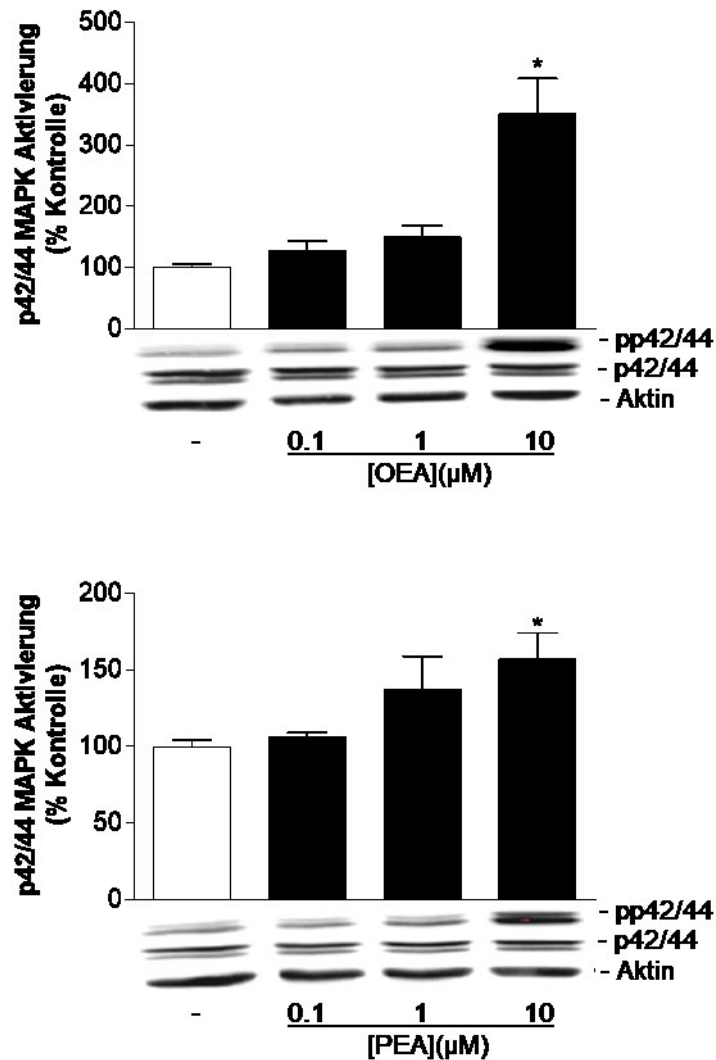


Abb. 20 Konzentrationsabhängige Aktivierung der p42/44 MAPK bedingt durch Endocannabinoid-ähnliche Substanzen. Zur Ermittlung des konzentrationsabhängigen Effekts der Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen auf die p42/44-MAPK-Aktivierung wurden Western Blots durchgeführt. ADSCs wurden 2 h mit Vehikel oder mit der Testsubstanz entsprechender Konzentration inkubiert. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren ($n = 6$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test. * $P < 0,05$

4.10 Rolle von CB₁, CB₂ und TRPV1 bei der Endocannabinoid-bedingten Migration

Zur Ermittlung der Rolle von Cannabinoidrezeptoren bzw. TRPV1 bei der promigratorischen Wirkung der FAAH-Substrate wurden Migrationsversuche durchgeführt, bei denen die Zellen vor der 6-h-Inkubation mit AEA bzw. 2-AG (je 10 μ M) für 1 h mit Antagonisten für CB₁, CB₂ und TRPV1 präinkubiert wurden (je 1 μ M, Tabelle 11). Hierbei konnte in Einklang mit den in Kapitel 4.5 vorgestellten Befunden mit FAAH-Inhibitoren gezeigt werden, dass CB₂ und TRPV1 maßgebend an der durch die FAAH-Substrate hervorgerufenen Migrationssteigerung beteiligt sind.

Tabelle 11 Rolle von CB₁, CB₂ und TRPV1 bei der Endocannabinoid-bedingten Migration. ADSCs wurden 1 h mit AM-251 (CB₁-Antagonist), AM-630 (CB₂-Antagonist) oder Capsazepin (Capsa, TRPV1-Antagonist) in einer Konzentration von 1 μ M präinkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von AEA bzw. 2-AG (10 μ M) und eine weitere Inkubation von 6 h. Als Kontrolle diente Vehikel. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor (n = 3 - 4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. Testsubstanz; n.s. (nicht signifikant)

	<i>Migration (% Kontrolle)</i>
Vehikel	100,0 \pm 24,6
AEA	229,5 \pm 30,5 *
AEA + AM-251	180,3 \pm 10,6 n.s.
AEA + AM-630	129,3 \pm 8,5 #
AEA + AM-251 + AM-630	127,8 \pm 11,0 #
AEA + Capsa	95,0 \pm 3,8 #
Vehikel	100,0 \pm 9,1
2-AG	240,3 \pm 35,9 *
2-AG + AM-251	170,0 \pm 19,2 n.s.
2-AG + AM-630	157,5 \pm 8,9 #
2-AG + AM-251 + AM-630	66,5 \pm 2,5 #
2-AG + Capsa	138,3 \pm 16,4 #

4.11 Rolle von PPAR α bei der promigrativen Wirkung von FAAH-Hemmern und FAAH-Substraten

4.11.1 Rolle von PPAR α bei der FAAH-Hemmer-bedingten Migration

Um zu ermitteln, ob PPAR α in den promigratorischen Effekt von URB597 bzw. AA-5HT involviert ist, wurde der Einfluss des selektiven PPAR α -Antagonisten GW6471 auf die Migration von ADSCs untersucht. Dazu wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. Der FAAH-Inhibitor-induzierte

promigratorische Effekt konnte durch Zugabe von GW6471 vollständig aufgehoben werden (Abb. 21).

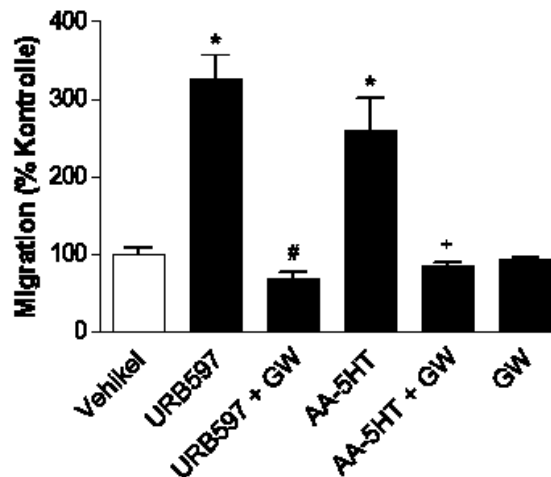


Abb. 21 Einfluss des PPAR α -Inhibitors GW6471 auf die URB597- bzw. AA-5HT-bedingte Migration. Zur Untersuchung der Rolle von PPAR α beim promigratorischen Effekt bedingt durch FAAH-Inhibitoren wurden Boyden-Kammer-Versuche mit GW6471 durchgeführt. ADSCs wurden 1 h mit GW6471 präinkubiert (10 μ M). Anschließend folgte eine 6-h-Inkubation mit URB597 bzw. AA-5HT (jeweils 10 μ M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P bzw. *P < 0,05 vs. jeweiligen FAAH-Hemmer

4.11.2 Rolle von PPAR α bei der promigrativen Wirkung von Endocannabinoiden bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen

Zur Untersuchung, ob PPAR α ebenso in die promigratorische Wirkung von Endocannabinoiden bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen involviert ist, wurde auch hier der Einfluss von GW6471 auf die Migration von ADSCs untersucht. In den hierzu durchgeführten Boyden-Kammer-Versuchen wurde der promigratorische Effekt aller vier FAAH-Substrate durch Zugabe von GW6471 vollständig aufgehoben (Abb. 22). Zusätzlich wurde mittels Capsazepin untersucht, ob TRPV1 bei der Migration bedingt durch Endocannabinoid-ähnliche Substanzen eine Rolle spielt. Der TRPV1-Antagonist Capsazepin (Capsa) führte zu einer signifikant verminderten Migration beider Endocannabinoid-ähnlicher Substanzen (Abb. 22).

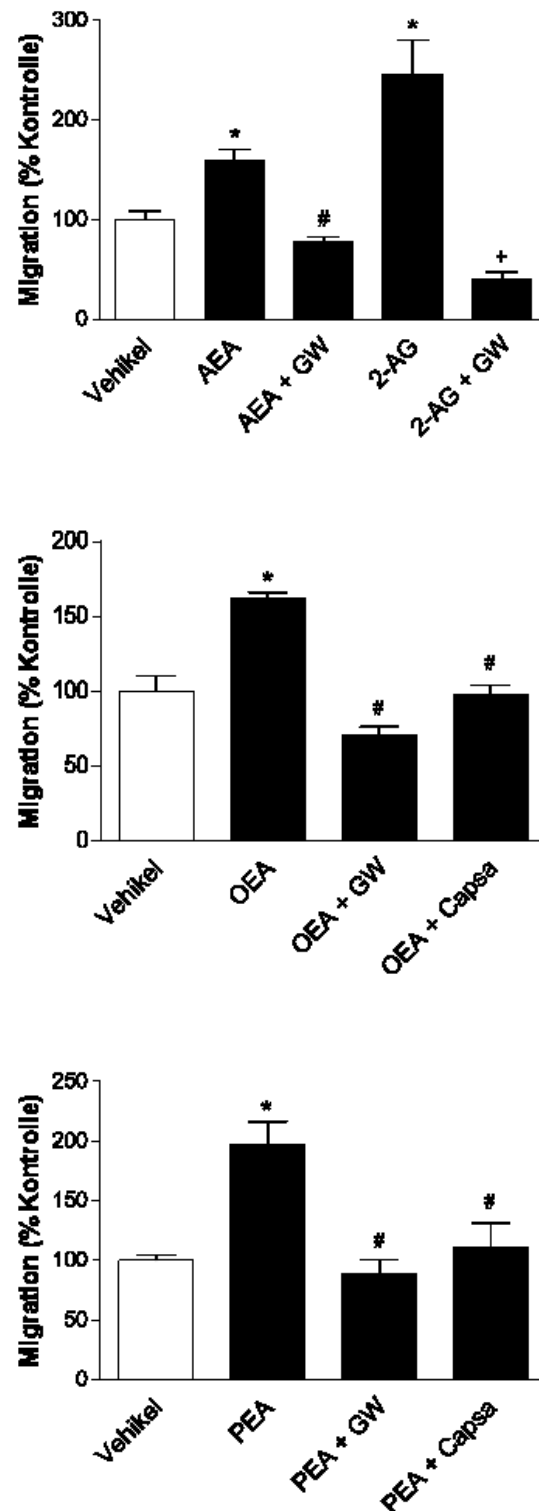


Abb. 22 Rolle von GW6471 bei der Migration bedingt durch Endocannabinoide bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen. Zur Untersuchung der Rolle von PPAR α beim promigratorischen Effekt bedingt durch Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen wurden Boyden-Kammer-Versuche mit GW6471 durchgeführt. ADSCs wurden 1 h mit GW6471 präinkubiert (10 μ M). Anschließend folgte eine 6-h-Inkubation mit Endocannabinoiden bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen (jeweils 10 μ M). Die Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen wurden zusätzlich 1 h mit Capsa (1 μ M), einem TRPV1-Antagonisten, präinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor (n = 4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. jeweiliger Testsubstanz

4.11.3 Wirkung des PPAR α -Agonisten WY14643 auf die Migration von ADSCs

Um zu untersuchen, ob die konzentrationsabhängige Induzierung der Migration bedingt durch FAAH-Inhibitoren (4.2.3) und Endocannabinoide bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen (4.8.2) durch den synthetischen PPAR α -Agonisten WY14643 nachgeahmt wird, wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass WY14643 ebenfalls einen konzentrationsabhängigen promigrativen Effekt auf ADSCs ausübt (Abb. 23).

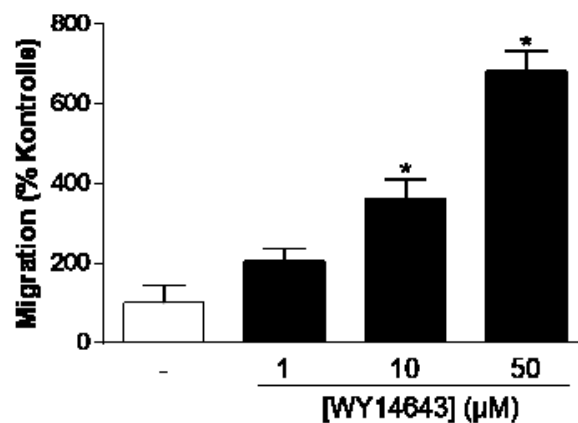


Abb. 23 Konzentrationsabhängiger promigratorischer Effekt von WY14643 auf ADSCs. Zur Ermittlung des Migrationsverhaltens von ADSCs unter Einfluss des selektiven PPAR α -Agonisten WY14643 wurden Boyden-Kammer-Versuche durchgeführt. ADSCs wurden 6 h mit Vehikel sowie WY14643 der entsprechenden Konzentration inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor ($n = 3 - 4$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test. * $P < 0,05$

4.12 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur PPAR α -Aktivierung

4.12.1 FAAH-Inhibitoren

Zur Bestätigung der Involvierung von PPAR α in die FAAH-Inhibitor-induzierte Migration wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Ein PPAR α -Antikörper wurde als Primärantikörper benutzt, ein fluoreszenzmarkierter Anti-Maus-Antikörper als Sekundärantikörper. Bisbenzimid, ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff, wurde zur Einfärbung des Zellkerns verwendet. Die Translokation und Akkumulation von PPAR α im Kern stellt ein anerkanntes Aktivierungsmerkmal dar (Xu et al, 2002). Um einen kausalen Zusammenhang zwischen PPAR α -Aktivierung und p42/44-MAPK-Phosphorylierung aufzuzeigen, wurde der p42/44-MAPK-Inhibitor PD98059 verwendet. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass eine 2-h-Inkubation mit 10 μ M URB597 bzw. AA-5HT im Vergleich zur Vehikelkontrolle zu einer signifikanten Steigerung der PPAR α -Aktivierung führt, welche durch PD98059 aufgehoben wird (Abb. 24; Abb. 25). Dies bestätigt die Involvierung von p42/44 MAPK. Als Kontrolle wurde weiterhin GW6471, ein PPAR α -Antagonist, eingesetzt. GW6471 führte zu einer signifikant verringerten Translokation von PPAR α in den Zellkern, d. h. zu einer signifikant verringerten PPAR α -Aktivierung (Abb. 24; Abb. 25)

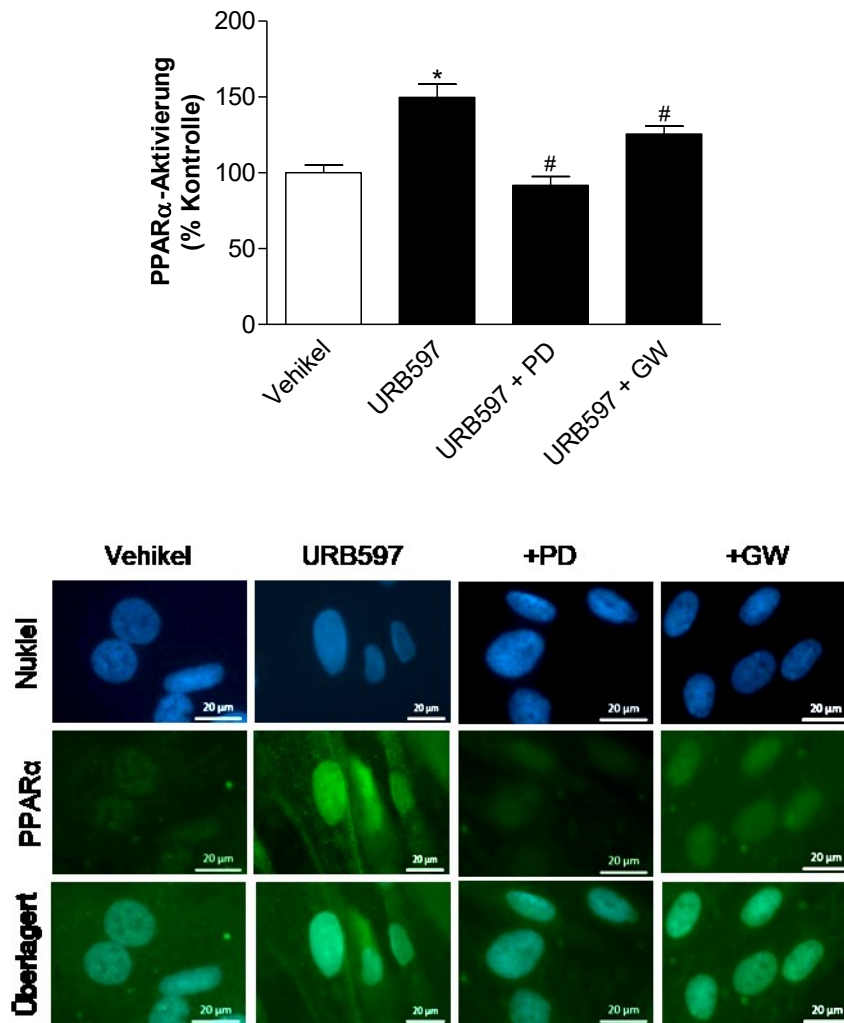


Abb. 24 Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle der p42/44 MAPK bei der URB597-bedingten Aktivierung von PPAR α . ADSCs wurden 1 h mit dem p42/44-MAPK-Aktivierungs-Inhibitor PD98059 (10 μ M) bzw. dem PPAR α -Antagonisten GW6471 präinkubiert. Anschließend folgte eine 2-h-Inkubation mit URB597 (10 μ M). Die PPAR α -Aktivierung wurde durch Messung der PPAR α -Akkumulation im Zellkern ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung basiert auf der Bindung eines primären Anti-PPAR α -Antikörpers an fixierte Zellen und einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488). Der Zellkörper wurde mithilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, Bisbenzimid, sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des PPAR α im Kern erfolgte durch überlagerte Messung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns und des PPAR α via Zeiss Zen Pro 2012 Analysis Software. Die exemplarischen Bilder zeigen die Zellkerne (Blau), PPAR α (Grün) sowie Zellkern und PPAR α überlagert (Türkis). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren (n = 45 - 65 Nuklei). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. URB597

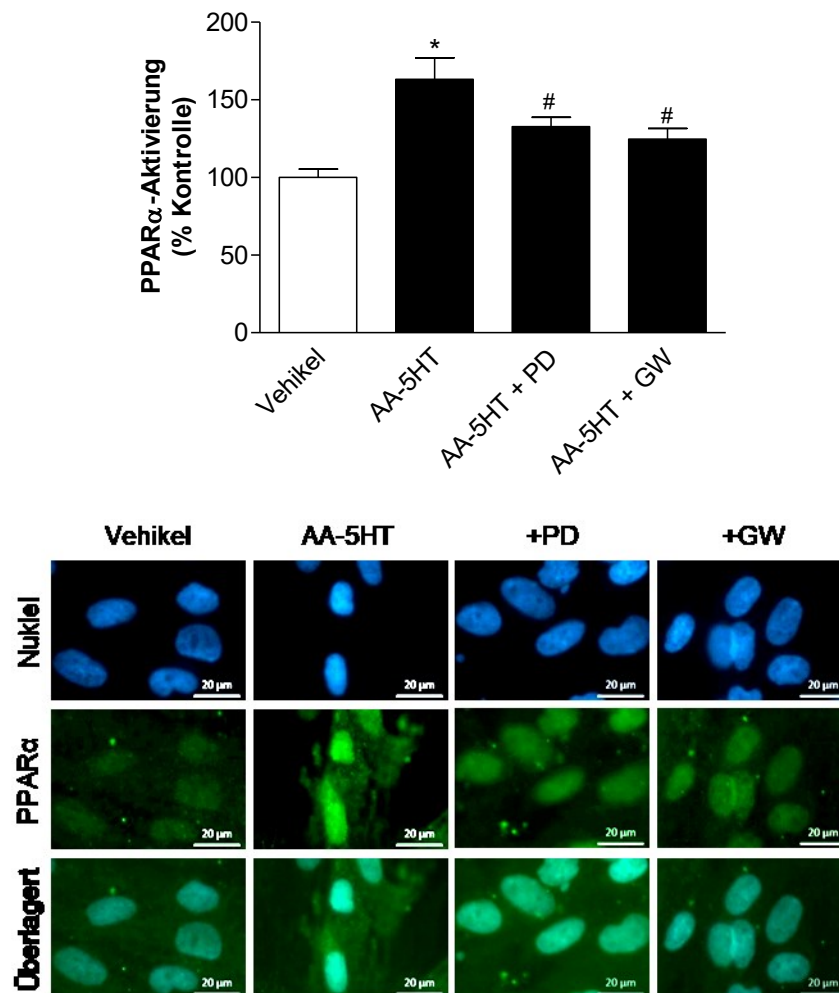


Abb. 25 Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle der p42/44 MAPK bei der AA-5HT-bedingten Aktivierung von PPARα. ADSCs wurden 1 h mit dem p42/44-MAPK-Aktivierungs-Inhibitor PD98059 (10 μ M) bzw. dem PPARα-Antagonisten GW6471 präinkubiert. Anschließend folgte eine 2-h-Inkubation mit AA-5HT (10 μ M). Die PPARα-Aktivierung wurde durch Messung der PPARα-Akkumulation im Zellkern ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung basiert auf der Bindung eines primären Anti-PPARα-Antikörpers an fixierte Zellen und einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488). Der Zellkörper wurde mithilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, Bisbenzimid, sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des PPARα im Kern erfolgte durch überlagerte Messung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns und des PPARα via Zeiss Zen Pro 2012 Analysis Software. Die exemplarischen Bilder zeigen die Zellkerne (Blau), PPARα (Grün) sowie Zellkern und PPARα überlagert (Türkis). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren (n = 44 - 51 Nuklei). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. AA-5HT

4.12.2 Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen

Um die Frage zu beantworten, ob auch FAAH-Substrate, welche nach Behandlung der ADSCs mit FAAH-Inhibitoren in den Zellen akkumulieren, eine p42/44-MAPK-abhängige PPAR α -Aktivierung hervorrufen, wurden die Endocannabinoide AEA und 2-AG sowie die Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen OEA und PEA mit dem in Kapitel 4.12.1. vorgestellten Versuchsprotokoll untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass eine 2-h-Inkubation mit 10 μ M AEA, 2-AG, OEA bzw. PEA im Vergleich zur Vehikelkontrolle zu einer signifikanten Steigerung der PPAR α -Aktivierung führt, welche durch PD98059 aufgehoben wird (Abb. 26; Abb. 27; Abb. 28). Dies bestätigt die Involvierung von p42/44 MAPK. Als Kontrolle wurde weiterhin GW6471, ein PPAR α -Antagonist, eingesetzt. GW6471 führte zu einer signifikant verringerten Translokation von PPAR α in den Zellkern, d. h. zu einer signifikant verringerten PPAR α -Aktivierung.

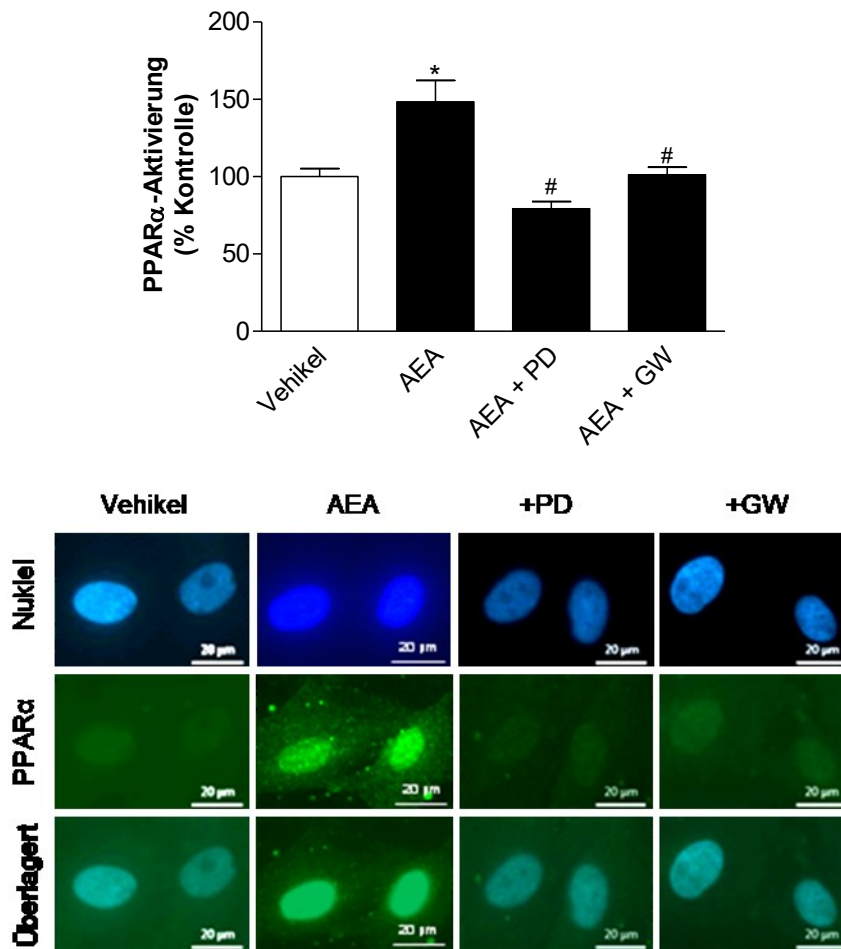


Abb. 26 Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle der p42/44 MAPK bei der AEA-bedingten Aktivierung von PPAR α . ADSCs wurden 1 h mit dem p42/44-MAPK-Aktivierungs-Inhibitor PD98059 (10 μ M) bzw. dem PPAR α -Antagonisten GW6471 präinkubiert. Anschließend folgte eine 2-h-Inkubation mit AEA (10 μ M). Die PPAR α -Aktivierung wurde durch Messung der PPAR α -Akkumulation im Zellkern ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung basiert auf der Bindung eines primären Anti-PPAR α -Antikörpers an fixierte Zellen und einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488). Der Zellkörper wurde mithilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, Bisbenzimid, sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des PPAR α im Kern erfolgte durch überlagerte Messung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns und des PPAR α via Zeiss Zen Pro 2012 Analysis Software. Die exemplarischen Bilder zeigen die Zellkerne (Blau), PPAR α (Grün) sowie Zellkern und PPAR α überlagert (Türkis). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von einem Donor (n = 40 - 43 Nuklei). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. AEA

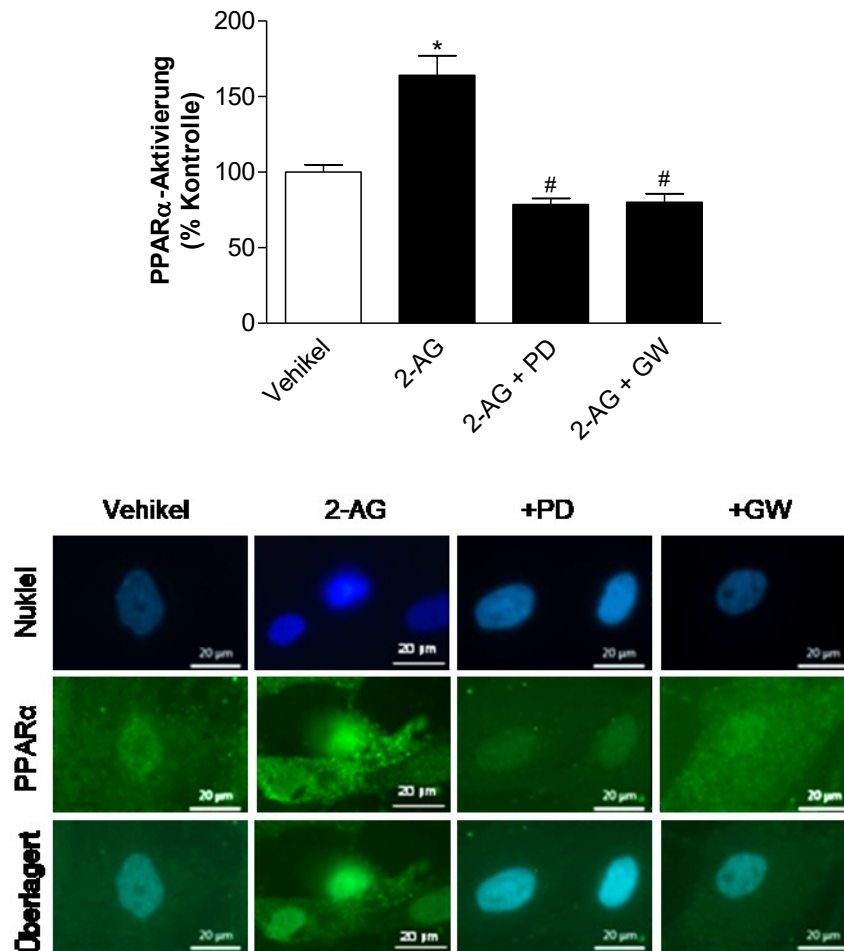


Abb. 27 Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle von p42/44 bei der 2-AG-bedingten Aktivierung von PPAR α . ADSCs wurden 1 h mit dem p42/44-MAPK-Inhibitor PD98059 (10 μ M) bzw. dem PPAR α -Antagonisten GW6471 präinkubiert. Anschließend folgte eine 2-h-Inkubation mit 2-AG (10 μ M). Die PPAR α -Aktivierung wurde durch Messung der PPAR α -Akkumulation im Zellkern ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung basiert auf der Bindung eines primären Anti-PPAR α -Antikörpers an fixierte Zellen und einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488). Der Zellkörper wurde mithilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, Bisbenzimid, sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des PPAR α im Kern erfolgte durch überlagerte Messung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns und des PPAR α via Zeiss Zen Pro 2012 Analysis Software. Die exemplarischen Bilder zeigen die Zellkerne (Blau), PPAR α (Grün) sowie Zellkern und PPAR α überlagert (Türkis). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren (n = 13 - 18 Nuklei). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. 2-AG

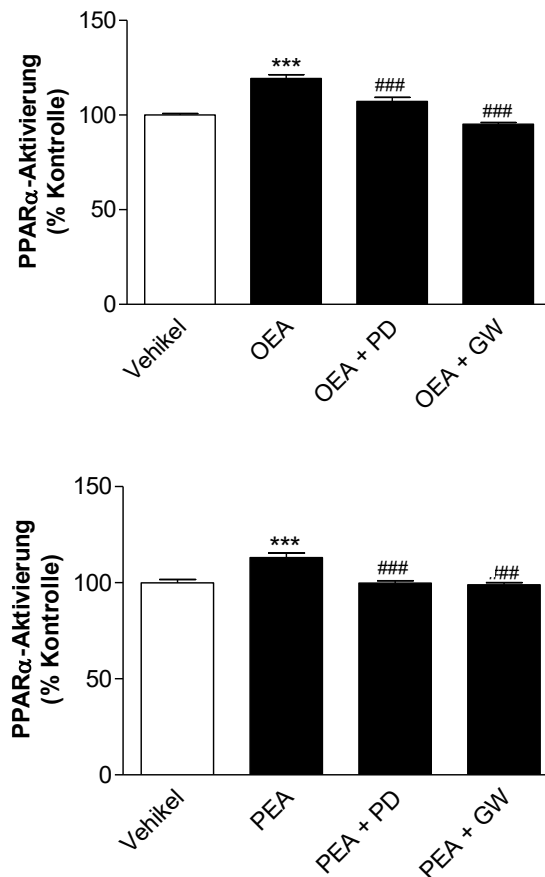


Abb. 28 Mikroskopische Untersuchung zur Rolle der p42/44 MAPK bei der Aktivierung von PPAR α bedingt durch Endocannabinoid-ähnliche Substanzen. ADSCs wurden 1 h mit dem p42/44-MAPK-Aktivierungs-Inhibitor PD98059 (10 μ M) bzw. dem PPAR α -Antagonisten GW6471 präinkubiert. Anschließend folgte eine 2-h-Inkubation mit OEA bzw. PEA (jeweils 10 μ M). Die PPAR α -Aktivierung wurde durch Messung der PPAR α -Akkumulation im Zellkern ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung basiert auf der Bindung eines primären Anti-PPAR α -Antikörpers an fixierte Zellen und einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488). Der Zellkörper wurde mithilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, Bisbenzimid, sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des PPAR α im Kern erfolgte durch überlagerte Messung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns und des PPAR α via Zeiss Zen Pro 2012 Analysis Software. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren (OEA: n = 46; PEA: n = 24 Nuklei). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; #P < 0,05 vs. OEA bzw. PEA

4.12.3 Einfluss von PD98059, GW6471 und WY14643 auf die PPAR α -Aktivierung

Um auszuschließen, dass die gezeigten Effekte das Resultat eines Eigeneffektes von PD98059 bzw. GW6471 sind, wurden entsprechende mikroskopische Untersuchungen zum Einfluss dieser Substanzen auf die Aktivierung von PPAR α durchgeführt. Diese zeigten, dass eine Inkubation mit 10 μ M PD98059 bzw. GW6471 im Vergleich zur Vehikelkontrolle zu keiner signifikanten Steigerung der PPAR α -Aktivierung führt. Um den promigratorischen Effekt von WY14643 auf ADSCs zu bestätigen und einen kausalen Zusammenhang zwischen PPAR α -Aktivierung und Migration zu unterstreichen, wurden ebenfalls mikroskopische

Versuche durchgeführt. Eine Inkubation mit 50 μM WY14643 führte zu einer signifikanten Steigerung der PPAR α -Aktivierung (Tabelle 12).

Tabelle 12 Einfluss von PD98059, GW6471 und WY14643 auf die PPAR α -Aktivierung in ADSC-Kernen. ADSCs wurden mit dem p42/44-MAPK-Aktivierungs-Inhibitor PD98059 (10 μM), dem PPAR α -Antagonisten GW6471 bzw. dem PPAR α -Agonisten WY14643 (50 μM) inkubiert. Die PPAR α -Aktivierung wurde durch Messung der PPAR α -Akkumulation im Zellkern ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung basiert auf der Bindung eines primären Anti-PPAR α -Antikörpers an fixierte Zellen und einem fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488). Der Zellkörper wurde mithilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, Bisbenzimid, sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des PPAR α im Kern erfolgte durch überlagerte Messung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns und des PPAR α via Zeiss Zen Pro 2012 Analysis Software. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von drei Donoren (Vehikel: n = 96, PD: n = 99; WY: n = 102 Nuklei), bzw. einem Donor (n = 42 Nuklei). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test (Vehikel, PD., WY) bzw. t-Test (Vehikel, GW). *P < 0,05 vs. Vehikelkontrolle; Protokoll analog 4.12.1 bzw. 4.12.2; n.s. (nicht signifikant).

PPARα-Aktivierung (% Kontrolle)	
Vehikel	100,0 \pm 1,1
GW6471	95,9 \pm 1,7 ^{n.s.}
Vehikel	100,0 \pm 3,4
PD98059	114,8 \pm 4,9 ^{n.s.}
WY14643	137,5 \pm 7,7*

4.12.4 Einfluss von GW6471 auf die FAAH-Hemmer-induzierte p42/44-MAPK-Aktivierung

Anhand der bisher ermittelten Daten wurde deutlich, dass die Inhibierung der p42/44-MAPK-Aktivierung der durch FAAH-Hemmer und -Substrate hervorgerufenen PPAR α -Aktivierung entgegenwirkt. Dies ließ vermuten, dass die p42/44-MAPK-Aktivierung upstream zur PPAR α -Aktivierung stattfindet. Um diese Hypothese zu untermauern wurden Western Blots durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass GW6471 keinen Einfluss auf die URB597-induzierte p42/44-MAPK-Aktivierung hat. Die AA-5HT-induzierte p42/44-MAPK-Aktivierung wurde durch GW6471 leicht, jedoch nicht signifikant, gehemmt (Abb. 29). GW6471 allein zeigte keinen Einfluss auf die basale p42/44-MAPK-Aktivierung (Abb. 29; Abb. 31). Analog konnte gezeigt werden, dass die p42/44-MAPK-Aktivierung bedingt durch Endocannabinoide bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen durch GW6471 nicht beeinflusst wurde (Abb. 30).

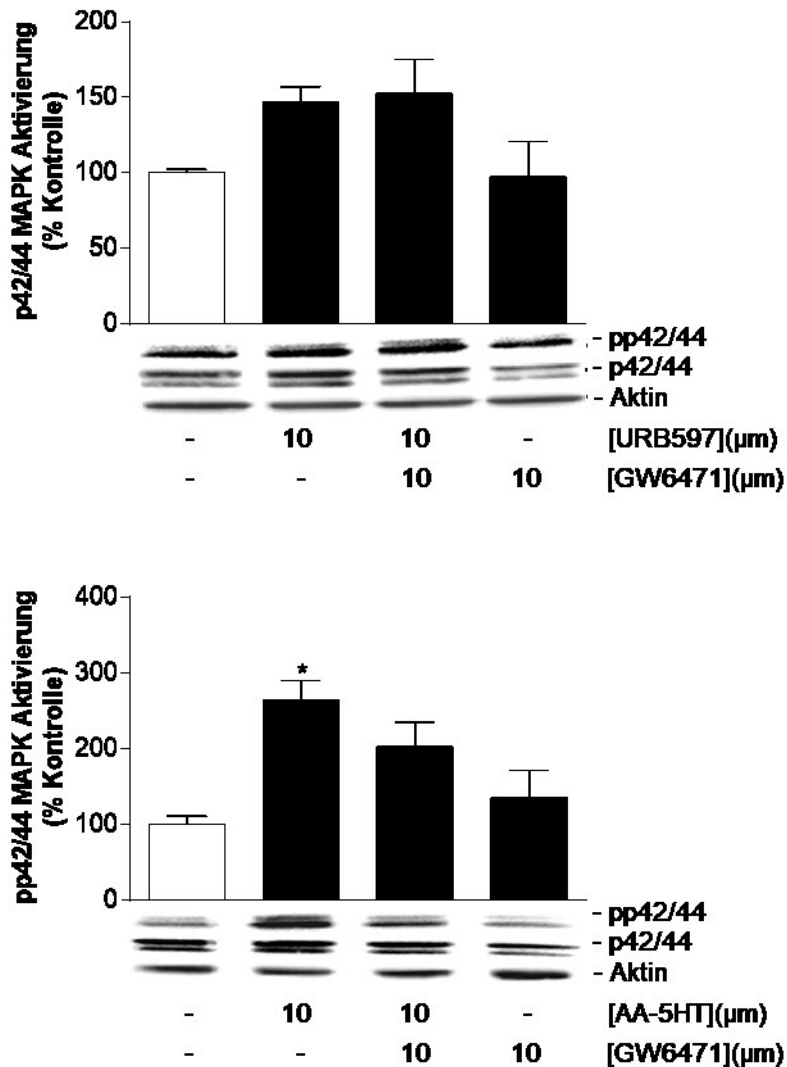


Abb. 29 Einfluss des PPAR α -Antagonisten GW6471 auf die p42/44-MAPK-Aktivierung bedingt durch FAAH-Inhibitoren. ADSCs wurden 1 h mit dem PPAR α -Antagonisten GW6471 (10 μ M) präinkubiert. Es folgte eine 2-h-Inkubation mit URB597 (10 μ M) bzw. AA-5HT (10 μ M). Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von drei Donoren (URB597, n = 5) bzw. zwei Donoren (AA-5HT, n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05

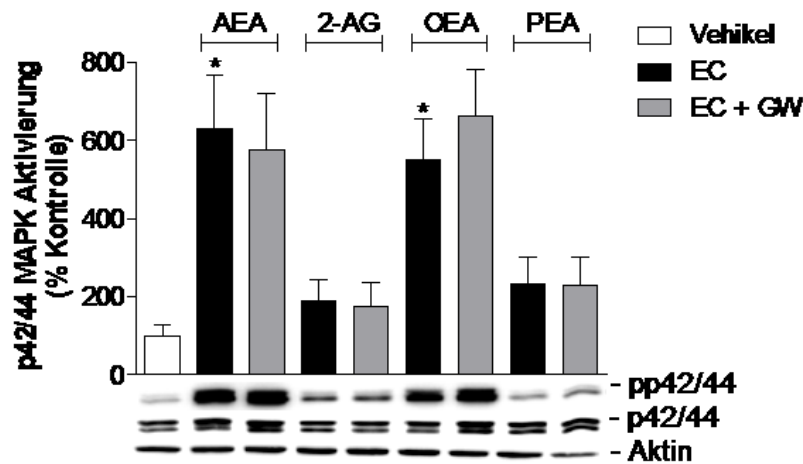


Abb. 30 Einfluss von PPAR α auf die p42/44-MAPK-Aktivierung bedingt durch Endocannabinoid- bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen. ADSCs wurden 1 h mit dem PPAR α -Antagonisten GW6471 (10 μ M) präinkubiert. Es folgten 2-h-Inkubationen mit Endocannabinoid bzw. Endocannabinoid-ähnlicher Substanz (je 10 μ M). Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von drei Donoren (n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. *P < 0,05

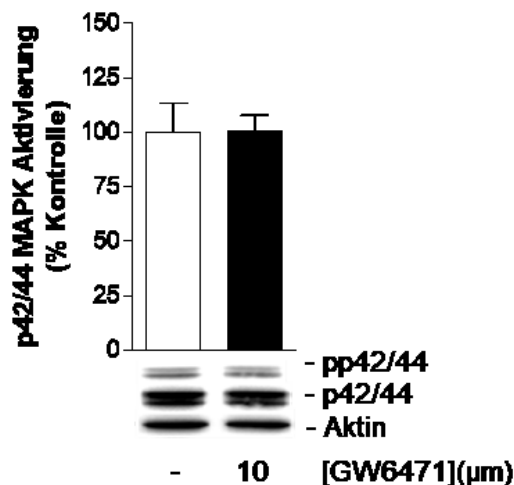


Abb. 31 Einfluss von GW6471 auf das basale Level der p42/44-MAPK-Aktivierung. ADSCs wurden 3 h mit dem PPAR α -Antagonisten GW6471 (10 μ M) inkubiert. Zur Auswertung der densitometrischen Daten wurde die phosphorylierte auf die nicht-phosphorylierte MAPK-Form normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von zwei Donoren (n = 6). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test. *P < 0,05

4.13 Einfluss von FAAH-Hemmern auf die osteogene Differenzierung von ADSCs

Aufgrund ihres hohen Proliferations- und Differenzierungspotenzials sind mesenchymale Stammzellen, zu denen ADSCs zählen, für diverse pharmakotherapeutische Anwendungen ein interessantes Ziel (Fiedler et al., 2002; Augello et al., 2010; Bakhshayesh et al., 2012). Sie sind zum Beispiel ein wichtiger Faktor bei der Gewebeheilung im Myokard (Huang et al., 2010), Auge (Walker et al., 2010) und Knochen (Yao et al., 2013). Weiterhin ist bekannt, dass transplantierte ADSCs die Knochenregenerierung fördern (Shoji et al., 2010; Choi et al., 2011). Eine neuere Studie konnte darüber hinaus nachweisen, dass eine Langzeit-Exposition mit Cannabidiol (CBD) die osteogene Differenzierung von ADSCs fördert (Schmuhl et al., 2013). Aus diesem Grund rückte die Induzierung dieser, als zusätzlicher Nachweis des funktionellen Effekts von FAAH-Inhibitoren auf ADSCs, in den Fokus unseres Interesses. ADSCs wurden 28 Tage (14 Tage) mit FAAH-Inhibitoren inkubiert. Als Kontrolle diente Vehikel. Die zwei untersuchten Faktoren für die osteogene Differenzierung waren die alkalische Phosphatase (ALP) und die Mineralisierung. ALP wurde mittels ALP-Färbung untersucht (Abb. 32), die Mineralisierung mittels Kresolphthaleinfärbung (Abb. 33). Die ALP-Färbung wurde mit einer Positivkontrolle durchgeführt. Dabei handelte es sich um ADSCs, welche durchgängig mit Osteogenesemedium (3.4.1.7) stimuliert wurden. Die ermittelten Daten wurden jeweils durch Bezug auf die Kristallviolett-Färbung normalisiert. URB597 bzw. AA-5HT zeigte keinen Einfluss auf die alkalische Phosphatase (Abb. 32). Hinsichtlich der Mineralisierung zeigten beide FAAH-Hemmer einen positiven Effekt (Abb. 33). Dieser positive Einfluss ist bei URB597 scheinbar durch einen Threshold gekennzeichnet. AA-5HT hingegen zeigte einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Mineralisierung. Aufgrund der hohen Varianzen zwischen den Donoren wurden die auf Kristallviolett-Färbung normalisierten Daten in der Form von min/max nominierten Box-Plots dargestellt.

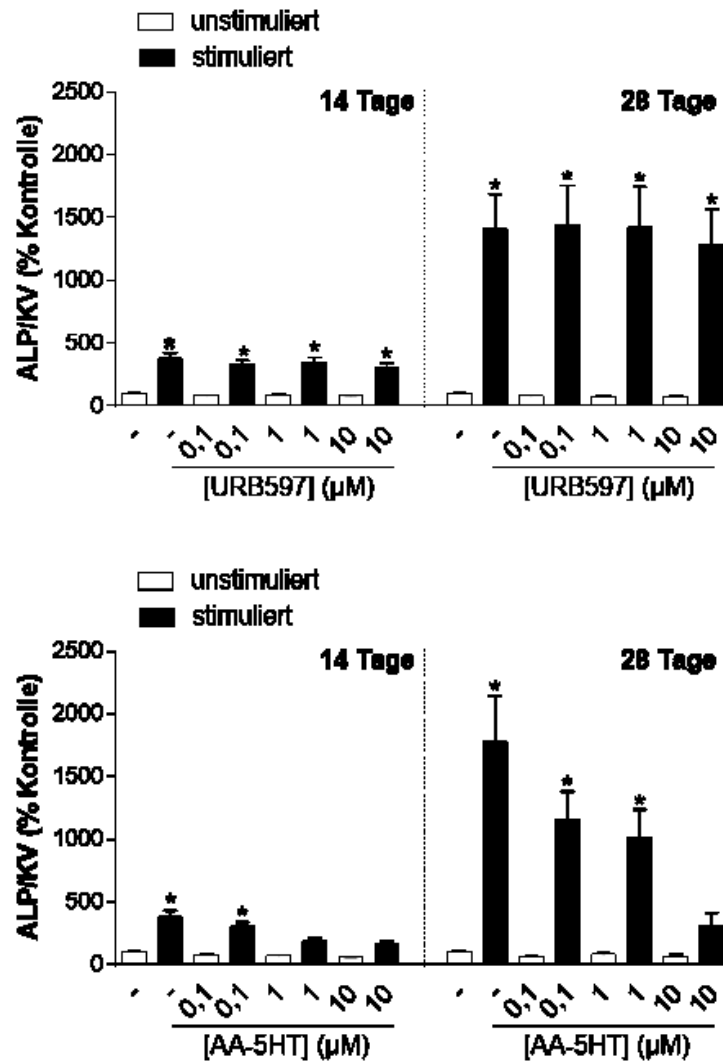


Abb. 32 Einfluss von URB597 bzw. AA-5HT auf die alkalische Phosphatase. ADSCs wurden 28 d (14 d) mit FAAH-Inhibitoren entsprechender Konzentration inkubiert. Zur Auswertung wurden die ermittelten Daten der ALP-Färbung auf die Kresolphthalein (KV)-Färbung normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von vier Donoren ($n = 16$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Bonferroni-Test. * $P < 0,05$

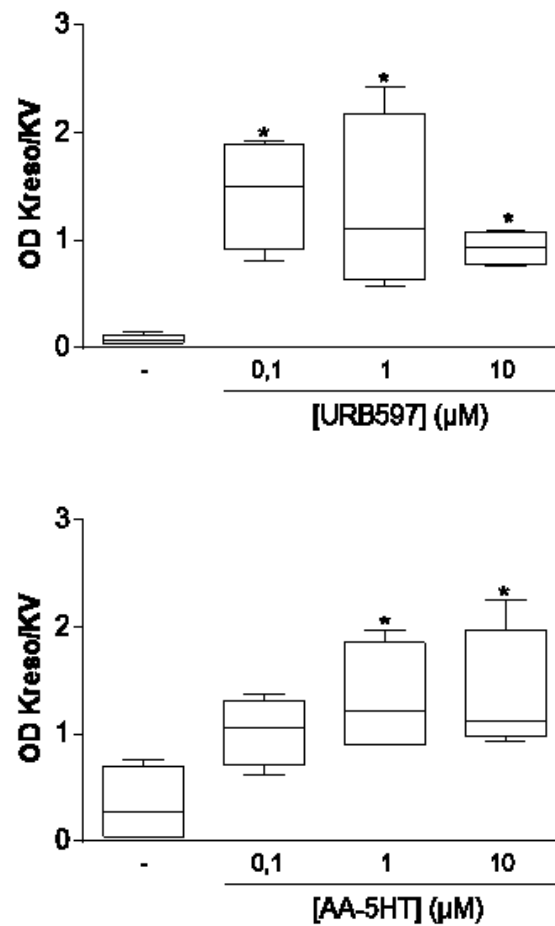


Abb. 33 Einfluss von URB597 bzw. AA-5HT auf die Mineralisierung. ADSCs wurden 28 d mit FAAH-Inhibitoren entsprechender Konzentration inkubiert. Zur Auswertung der Daten wurden die optischen Dichten der Kresolphthalein (Kreso)-Färbung auf die Kristallviolett (KV)-Färbung normalisiert. Dargestellt sind min/max normierte Box-Plots im Vergleich zur Vehikelkontrolle (100 %) von vier Donoren (URB597; n = 17) bzw. sechs Donoren (AA-5HT; n = 31). Die statistische Auswertung erfolgte mittels 1-way ANOVA plus post hoc Dunnett-Test. *P < 0,05

5 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand das Endocannabinoid-abbauende Enzym FAAH, dessen Hemmung zu einer Verringerung der Degradation und damit indirekt zu einer autokrinen protrahierten Wirkung von Endocannabinoiden führt (Cravatt et al., 2001; Patel et al., 2005). Es konnte ein erstmaliger Nachweis darüber erbracht werden, dass FAAH-Inhibitoren eine promigratorische Wirkung auf MSCs haben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen die Migration von MSCs induzieren. Als zugrunde liegender Signalweg wurde die p42/44-MAPK-Phosphorylierung mit anschließender PPAR α -Aktivierung identifiziert.

Als experimentelles System dienten ADSCs, d. h. mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (Lin et al., 2010). ADSCs sind aufgrund mangelnder definitiver Zellmarker schwer zu charakterisieren. Als guter Marker hat sich CD34 erwiesen. Während der Kultivierungsphase waren die ADSCs, entsprechend der Literaturangaben, durchgängig spindelförmig und ähnelten Fibroblasten (Pittenger et al., 1999).

Obwohl FAAH-Inhibitoren derzeit in Phase-II-Studien zur Schmerzbehandlung getestet werden (Benson et al., 2014), gab es bislang keinerlei Daten bezüglich der Rolle dieser Substanzen bei der Migration bzw. osteogenen Differenzierung von ADSCs. Die vorliegende Arbeit belegt erstmals, dass die Inhibierung der FAAH durch URB597 bzw. AA-5HT die Migration von ADSCs induziert. Dieser promigratorische Effekt konnte durch PD98059, einen Inhibitor der p42/44 MAPK Aktivierung, rückgängig gemacht werden. Weiterhin zeigte sich, dass dieser promigratorische Effekt zeit- und konzentrationsabhängig ist und nicht das Ergebnis einer gesteigerten Viabilität darstellt. SB203580, ein Inhibitor der p38 MAPK, führte hingegen zu keiner signifikanten Verminderung des FAAH-Inhibitor-bedingten promigratorischen Effekts. Die Aktivierung der p42/44-MAPK-Signalkaskade durch FAAH-Inhibitoren war ebenfalls zeit- und konzentrationsabhängig. Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, dass die Inhibierung der FAAH durch URB597 bzw. AA-5HT einen via p42/44-MAPK-wirkenden promigratorischen Effekt auf ADSCs hat. Im Hinblick auf die Involvement der p42/44 MAPK konnte bereits in einer früheren Arbeit unserer Gruppe demonstriert werden, dass die promigrative Wirkung von Cannabidiol via

Aktivierung der p42/44 MAPK vermittelt wird (Schmuhl et al., 2014). Darüber hinaus belegen Arbeiten von Yang sowie Song und Zhong einen Zusammenhang zwischen Cannabinoid-bedingter Migration und p42/44-MAPK-Aktivierung (Song und Zhong, 2000; Yang et al., 2010). Im nächsten Schritt wurden exogene Endocannabinoide (AEA, 2-AG) und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen (OEA, PEA) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Migration von ADSCs und p42/44-MAPK-Aktivierung untersucht. Dabei konnten die FAAH-Inhibitor-Versuche bestätigt werden. Dementsprechend wurde nach exogener Zugabe von Endocannabinoiden bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen ein konzentrationsabhängiger, via p42/44-MAPK-vermittelter Anstieg der Migration registriert. Auch dieser Effekt war nicht das Ergebnis gesteigerter Viabilität durch die Testsubstanzen.

Wie bereits erwähnt führt die Hemmung der FAAH zu einer Verringerung der Degradation und damit indirekt zu einer autokrinen protrahierten Cannabinoid-Wirkung (Cravatt et al., 2001; Patel et al., 2005). Um diesen Einfluss zu belegen, wurden LC-MS-Analysen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass AEA, 2-AG, OEA und PEA nach Inhibierung der FAAH durch URB597 bzw. AA-5HT in den Zellen akkumulieren.

Es ist bekannt, dass Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen mit PPAR α interagieren (Kozak et al., 2002; Fu et al., 2003; LoVerme et al., 2005; Sun et al., 2007). Darüber hinaus werden eine Reihe von biologischen Effekten der Inhibierung von FAAH mit der Aktivierung von PPAR α assoziiert (O'Sullivan, 2007; Jhaveri et al., 2008; Mazzola et al., 2009; Justinova et al., 2015). Aus diesem Grund wurden Migrationsversuche zum Einfluss des PPAR α -Inhibitors GW6471 auf die FAAH-Inhibitor-bedingte Migration durchgeführt. Im Ergebnis dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass der URB597- bzw. AA-5HT-bedingte promigratorische Effekt durch GW6471 vollständig aufgehoben wird. Damit konnte eine Schlüsselrolle für PPAR α in der promigratorischen Wirkung der beiden Testsubstanzen nachgewiesen werden. Der kausale Zusammenhang zwischen PPAR α -Aktivierung und Migration von ADSCs wurde durch Migrationsversuche mit dem PPAR α -Agonisten WY14643 untermauert, der zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Migration führte. Analoge Migrationsversuche wurden auch mit exogen applizierten

Endocannabinoiden (AEA, 2-AG) und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen (OEA, PEA) durchgeführt, wobei auch der durch diese Substanzen bedingte promigratorische Effekt durch GW6471 vollständig aufgehoben wurde.

Zur Bestätigung der Rolle von PPAR α als Vermittler der promigrativen Wirkung von FAAH-Hemmern und -Substraten wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Quantifizierung der PPAR α -Aktivierung durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein anerkanntes Verfahren zur Bestimmung der PPAR α -Aktivierung, bei dem die Translokation von PPAR α in den Nukleus gemessen wird (Xu et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl FAAH-Inhibitoren als auch Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen PPAR α aktivieren. In jedem Fall wirkt GW6471 dieser Aktivierung entgegen. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass der Inhibitor der p42/44-MAPK-Aktivierung PD98059 die Aktivierung von PPAR α hemmt. Die p42/44-MAPK-Aktivierung ist somit in der promigratorischen Signalkaskade der PPAR α -Aktivierung vorgeschaltet. Ein Eigeneffekt von PD98059 oder GW6471 konnte ausgeschlossen werden. Zur Untermauerung der p42/44 MAPK \rightarrow PPAR α -Signalkaskade wurden Western Blots durchgeführt. Die Aktivierung der p42/44 MAPK, bedingt durch FAAH-Inhibitoren bzw. Endocannabinoide oder Endocannabinoid-ähnliche Substanzen, wurde nicht durch GW6471 inhibiert. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die PPAR α -Aktivierung der p42/44-MAPK-Aktivierung vorgeschaltet ist. Dieses Kontrollexperiment wurde durchgeführt, da es durchaus in der Literatur Daten gibt, die belegen, dass PPARs an unterschiedlichen Stellen der Signalkaskade eingreifen können, wie z. B. durch Eingriff in die Phosphorylierungskaskade oder durch DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren (Rotman und Wahli, 2010). Auch in diesen Experimenten zeigte GW6471 keinen Eigeneffekt, der die entsprechende Dateninterpretation infrage hätte stellen können. In der vorliegenden Arbeit wurde die PPAR α -Aktivierung bei allen getesteten Endocannabinoiden (AEA, 2-AG) bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen (OEA, PEA) durch PD98059 aufgehoben, was darauf schließen lässt, dass die genannten Substanzen PPAR α via p42/44 MAPK aktivieren. Neben der direkten Bindung an PPAR α (Sun et al., 2006) erscheint demnach ein komplexerer Mechanismus der PPAR-Aktivierung zu existieren. Eine Aktivierung von PPAR α durch p42/44 MAPK ist auch in der Literatur dokumentiert. So führt die Behandlung von Hepatozyten mit Insulin zu

einer Phosphorylierung und Aktivierung von PPAR α via p42/44 MAPK (Shalev et al., 1996). Die Insulin-induzierte Transaktivierung basiert auf der Phosphorylierung zweier Serine (12 und 21) in der A/B Domäne des humanen PPAR α (Vanden Heuvel et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Vanden Heuvel demonstrierte weiterhin eine Inhibierung der PPAR α -Aktivierung durch PD98059 (Vanden Heuvel et al., 1999).

PPARs sind für die Forschung von besonderem Interesse, da sie ein interessantes Ziel für die pharmakotherapeutische Behandlung diverser Erkrankungen darstellen, wie z. B. Fettstoffwechselstörungen oder Typ-2-Diabetes (Rotman und Wahli, 2010). Ein Verständnis der involvierten Signalkaskaden ist demnach entscheidend. Die Wirkung von PPAR-Liganden via MAPK wurde z. B. auch durch die Arbeitsgruppe um Gardner gezeigt, welche demonstrierte, dass PPAR α - und PPAR γ -Agonisten p42/44 MAPK bzw. p38 MAPK aktivieren (Gardner et al., 2003). Wie bereits erwähnt, ist bekannt, dass Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen mit PPAR α interagieren (Burns und Heuvel, 2007). Den ersten Nachweis zur Interaktion von PPARs und Cannabinoiden erbrachte die Arbeitsgruppe um Kozak, welche zeigen konnte, dass ein Metabolit von 2-AG, generiert durch die 15-Lipoxygenase, mit PPAR α interagiert (Kozak et al., 2002). Im Jahre 2003 erbrachte die Arbeitsgruppe um Fu den ersten Beweis, dass OEA an PPAR α bindet und dessen transkriptionelle Aktivität erhöht (Fu et al., 2003). Die Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus zeigen, dass PPAR α -knockout-Mäuse den OEA-induzierten appetithemmenden und gewichtsreduzierenden Effekt nicht aufweisen (Fu et al., 2003). Andere OEA-assoziierte Effekte, wie Lipolyse und Neuroprotektion, konnten ebenfalls auf eine PPAR α -Interaktion zurückgeführt werden (Guzman et al., 2004; Sun et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um LoVerme konnte weiterhin PEA-induzierte, anti-inflammatorische und analgetische Effekte auf die Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von PPAR α zurückführen (LoVerme et al., 2005). Andere an PPAR α bindende Cannabinoide sind AEA, Noladin Ether und Virodhamin (Sun et al., 2007). Erst vor Kurzem konnte die Relaxation der Augenarterien auf eine Interaktion von AEA mit PPAR α zurückgeführt werden (Romano et al., 2012).

Die Rolle von PPAR α bei der Migration wird kontrovers diskutiert. Die in dieser Studie vorgelegten Daten decken sich mit den Aussagen der Arbeitsgruppen um Rothman und Wahli und Werner (Rotmana und Wahli, 2010; Werner et al., 2014). Rotman und Wahli demonstrierten, dass eine erhöhte PPAR α -Aktivierung zu einer gesteigerten Migration von zirkulierenden angiogenen Zellen führt (Rotmana und Wahli, 2010). Werner et al. (2014) demonstrierten den Zusammenhang zwischen PPAR α -Aktivierung und Migration bei U937-Zellen. Im Gegensatz dazu wird die Migration von glatten Muskelzellen und Nabelvenen-Endothel-Zellen durch PPAR α -Aktivierung gehemmt (Hornung et al., 2001; Stephen et al., 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit den Daten der Literatur verdeutlichen, dass die Regulation der Migration durch PPAR α Zell- und Stimulus-abhängig vermittelt wird. Werner et al. demonstrierten weiterhin, dass Akt mechanistisch bei der PPAR α -induzierten Migration eine Rolle spielt (Werner et al., 2014).

Entsprechend früher publizierter Daten unserer Gruppe exprimieren ADSCs sowohl CB₁ und CB₂ als auch TRPV1 (Schmuhl et al., 2014). In der Literatur ist beschrieben, dass CB₁ und CB₂ die p42/44-MAPK-Signalkaskade triggern können. So wird der Einfluss von Endocannabinoiden auf die Migration von hämatopoetischen Stammzellen via CB₂-Rezeptor moduliert, welcher wiederum die p42/44-MAPK-abhängige Signalkaskade aktiviert (Galve-Roperh et al., 2013). In murinen Osteoblasten-artigen Zellen, d. h. Zellen der mesenchymalen Nische, zeigte HU-308 einen promigratorischen Effekt via Aktivierung von CB₂ (Sophocleous et al., 2011). Die Aktivierung von CB₁ in neuronalen Vorläuferzellen verursacht eine Aktivierung der p42/44-MAPK-Signalkaskade (Galve-Roperh et al., 2013). AEA und 2-AG wirken via Cannabinoidrezeptoren, OEA und PEA wirken via PPAR α (Brown, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CB₂ und TRPV1 eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielen. Dies wird durch die vollständige (URB597, AA-5HT, AEA, OEA, PEA) bzw. partielle (2-AG) Inhibierung der Migration durch Capsazepin (Capsa) bestätigt. Literaturangaben zur Aktivierung von TRPV1 durch AEA (Wisnoskey et al., 2003), 2-AG (Zygmunt et al., 2013), OEA (Ahern, 2003) und PEA (Ambrosino et al., 2013) sowie die Untersuchungen von Schmuhl et al. (2014), die zeigen konnten, dass die durch CBD hervorgerufene p42/44-MAPK-Aktivierung durch AM-630 abgeschwächt wird (Schmuhl et al., 2014),

unterstreichen die erhobenen Daten. Darüber hinaus gibt es Studien, die belegen, dass TRPV1 die p42/44 MAPK aktivieren kann (Chen et al., 2009). Allerdings wird die Interpretation unserer Daten dadurch abgeschwächt, dass Capsazepin selbst die basale Migration mindert (Schmuhl et al., 2014). Die experimentelle Durchführung der LC-MS-Analyse zur Ermittlung der FAAH-Substrat-Level in Zelllysaten führte dazu, dass die akkumulierten Endocannabinoid- bzw. Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen in pmol/mg Protein angegeben wurden. Als Konsequenz daraus waren endogene und exogene Konzentrationen der Endocannabinoid- bzw. der Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen nicht direkt vergleichbar.

In der Literatur gibt es viele Beispiele für den Einfluss von Cannabinoiden auf die Differenzierung von Stammzellen. AEA spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Trophoblasten (Wang et al., 1999; Wang und Dey, 2005; Habayeb et al., 2008; Sun et al., 2010). Bei neuronalen Vorläufer-/Stammzellen wirkt das Endocannabinoidsystem via CB₁ regulatorisch bezüglich Zellproliferation, Differenzierung und Migration (Harkany et al., 2007; Diaz-Alonso et al., 2012). Studien der Arbeitsgruppen um Carayon, Lombard und Sugawara haben gezeigt, dass das Endocannabinoidsystem eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von B-, T- und Mastzellen spielt (Carayon et al., 1998; Lombard et al., 2011; Sugawara et al., 2012). AEA stimuliert die Adipozyten-Differenzierung via CB₁ oder PPAR γ (Bouaboula et al., 2005; Gasperi et al., 2007). Eine Inhibierung bzw. genetische Inaktivierung von CB₁ führt zu einer defekten Osteoklasten-Differenzierung (Idris et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von FAAH-Inhibitoren auf die Differenzierung von ADSCs untersucht. Die Knochenbildung geht von den Osteoblasten aus und verläuft schrittweise: 1) Bereitstellung der Vorläuferzellen; 2) Proliferation; 3) Differenzierung zu Osteoblasten; 4) Ablagerung der organischen Knochenmatrix; 5) Kalzifizierung; 6) Knochenumbau (Jerosch et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass FAAH-Inhibitoren die Mineralisierung stimulieren. Allerdings konnte eine verstärkte alkalische Phosphatase-Generierung nicht nachgewiesen werden. ALP gilt allgemein als Osteoblasten-Marker, ist aber nicht knochenspezifisch. Die Präsenz von ALP kann als Differenzierungsmarker angesehen werden, aber nicht als Lineage-Marker (Köllmer et al., 2013). Die Tatsache, dass eine FAAH-Inhibitor-induzierte

Mineralisierung bzw. Kalzifizierung nachgewiesen werden konnte, spricht jedoch dafür, dass die untersuchten FAAH-Inhibitoren die Osteogenese induzieren. Eine mögliche Erklärung für den nicht erbrachten Nachweis der erhöhten ALP-Aktivität könnte in der limitierten Anzahl entsprechender Messzeitpunkte liegen. Im Gegensatz zu den Befunden der vorliegenden Arbeit konnten Schmuhl et al. (2014) zeigen, dass Cannabidiol zu einer Erhöhung der ALP-Aktivität führt. In der entsprechenden Arbeit wurde die ALP-Aktivität nach 35 Tagen gemessen. Zu diesem Zeitpunkt begann die Cannabidiol-bedingte Mineralisierung. In der vorliegenden Arbeit war die durch FAAH-Hemmer hervorgerufene Mineralisierung bereits nach 28 Tagen stark fortgeschritten, was vermuten lässt, dass die ALP aus diesem Grund zum genannten Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar war. In der Literatur ist belegt, dass die ALP einen frühen Osteogenese-Marker darstellt (Malaval et al., 1994). Dafür würde auch die konzentrationsabhängige Abnahme der ALP bedingt durch AA-5HT sprechen. Um die genauen Vorgänge zu verstehen, ist es nötig, die Kinetik der FAAH-Inhibitor-bedingten Mineralisierung zu untersuchen.

Zusammenfassend sprechen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten dafür, dass FAAH-Inhibitoren und -Substrate promigrativ auf ADSCs wirken. Dieser promigratorische Effekt wird via CB₂ und TRPV1 vermittelt, ist p42/44-MAPK-abhängig und verläuft via p42/44-MAPK-abhängige PPAR α -Aktivierung. Die Ergebnisse bilden eine interessante Forschungsgrundlage für *in vivo* Studien zur Rolle der FAAH bei regenerativen Therapien. Es gibt in diesem Zusammenhang bereits Daten von Tierexperimenten, welche die Effektivität einer FAAH-Inhibition bei der Behandlung von akuten, inflammatorischen, viszeralen und neuropathischen sowie osteoarthritischen Schmerzen demonstrieren (Pertwee, 2014). Ein weiteres Anwendungsgebiet, impliziert durch die vorliegenden Ergebnisse, ist die Wundheilung. Ein entscheidender Faktor beim Gewebeheilungsprozess ist die zelluläre Migration, welche durch Endocannabinoide bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen positiv beeinflusst wird.

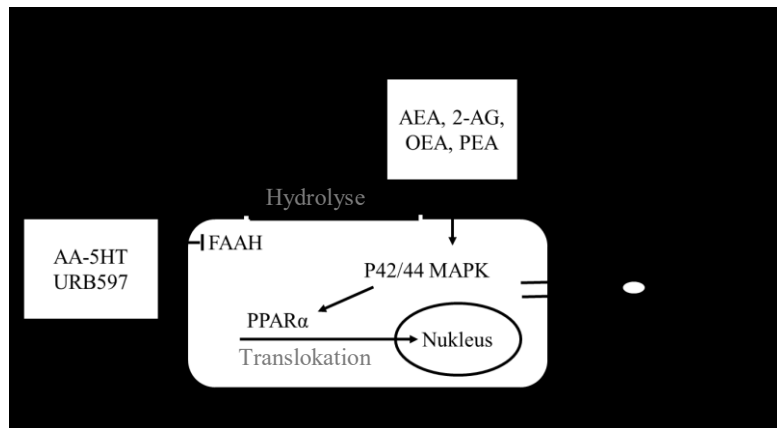


Abb. 34 Grafische Darstellung der Ergebnisse. FAAH-Inhibitoren, Endocannabinoide und Endocannabinoid-ähnliche Substanzen induzieren die Migration von mesenchymalen Stammzellen. Als zugrunde liegender Signalweg wurde die Phosphorylierung der p42/44 MAPK und eine nachfolgende Aktivierung von PPAR α identifiziert.

6 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen spielen aufgrund ihres Migrations- und Differenzierungspotenzials eine entscheidende Rolle bei Gewebeheilungsprozessen. Das Endocannabinoidsystem (Rezeptoren, Liganden, Synthese- und Degradationsenzyme) ist eine attraktive Zielstruktur für verschiedene pharmakotherapeutische Strategien zur Behandlung von osteodegenerativen Erkrankungen und Knochenbrüchen. Im Fokus der Dissertation steht das Endocannabinoid-abbauende Enzym FAAH, dessen Hemmung zu einer Verringerung der Degradation und damit indirekt zu einer autokrinen protrahierten Cannabinoid-Wirkung führt. Substrate der FAAH sind Anandamid (AEA), 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), N-Oleoylethanolamin (OEA) und N-Palmitoylethanolamin (PEA). Mittels Boyden-Kammer-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT promigrativ wirken. Dieser Effekt war zeit- und konzentrationsabhängig. LC-MS-Analysen demonstrierten, dass alle genannten FAAH-Substrate durch FAAH-Inhibitoren in den Zellen akkumulieren. Nach exogener Zugabe zu ADSCs zeigten alle gemessenen FAAH-Substrate die gleiche promigratorische Wirkung wie die FAAH-Inhibitoren. Der promigratorische Effekt von FAAH-Inhibitoren und -Substraten ist kausal auf die Aktivierung der p42/44 MAPK sowie die Zytosol-zu-Nukleus Translokation von PPAR α zurückzuführen. Die beobachtete PPAR α -Aktivierung durch FAAH-Inhibitoren und -Substrate konnte durch Inhibierung der p42/44-MAPK-Signalkaskade aufgehoben werden. Eine Blockierung von PPAR α hatte keinen Einfluss auf die p42/44-MAPK-Aktivierung. Zusammenfassend sprechen die erhobenen Daten dafür, dass FAAH-Inhibitoren und -Substrate die p42/44-MAPK-Phosphorylierung induzieren, welche wiederum dazu führt, dass PPAR α aktiviert wird, was ultimativ den promigratorischen Effekt induziert. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass FAAH-Inhibitoren die Osteogenese induzieren. Diese Effekte bilden eine mögliche Grundlage der regenerativen Wirkung von Endocannabinoiden. Die endogene Endocannabinoid-Degradation könnte somit ein interessantes Target für entsprechende pharmakotherapeutische Intervention darstellen.

7 Summary

Regenerative activity in tissues of mesenchymal origin depends on the migratory potential of mesenchymal stem cells (MSCs). The present study focused on inhibitors of the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH), which catalyzes the degradation of endocannabinoids (anandamide, 2-arachidonoylglycerol) and endocannabinoid-like substances (*N*-oleoylethanolamine, *N*-palmitoylethanolamine). Using Boyden chamber assays, the FAAH inhibitors, URB597 and arachidonoyl serotonin (AA-5HT) were found to increase the migration of human adipose-derived MSCs. LC-MS analyses revealed increased levels of all four aforementioned FAAH substrates in MSCs incubated with either FAAH inhibitor. Following addition to MSCs, all FAAH substrates mimicked the promigratory action of FAAH inhibitors. Promigratory effects of FAAH inhibitors and substrates were causally linked to activation of p42/44 MAPKs, as well as to cytosol-to-nucleus translocation of the transcription factor, PPAR α . Whereas PPAR α activation by FAAH inhibitors and substrates became reversed upon inhibition of p42/44 MAPK activation, a blockade of PPAR α left p42/44 MAPK phosphorylation unaltered. Collectively, these data demonstrate FAAH inhibitors and substrates to cause p42/44 MAPK phosphorylation, which subsequently activates PPAR α to confer increased migration of MSCs. This novel pathway may be involved in regenerative effects of endocannabinoids whose degradation could be a target of pharmacological intervention by FAAH inhibitors.

8 Quellen

- Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 2003; 278:30429-34.
- Ahn K, Johnson DS, Fitzgerald LR, Liimatta M, Arendse A, Stevenson T, Lund ET, Nugent RA, Nomanbhoy TK, Alexander JP, Cravatt BF. Novel mechanistic class of fatty acid amide hydrolase inhibitors with remarkable selectivity. *Biochemistry* 2007; 46:13019-30.
- Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev* 2008; 108:1687-707.
- Alexander JP, Cravatt BF. Mechanism of carbamate inactivation of FAAH: Implications for the design of covalent inhibitors and *in vivo* functional probes for enzymes. *Chem Biol* 2005; 12:1179-87.
- Ambrosino P, Soldovieri MV, Russo C, Tagliatalata M. Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPAR α agonist palmitoylethanolamide. *Br J Pharmacol* 2013; 168:1430-44.
- Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Eur Cell Mater* 2010; 20: 121-33.
- Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effects of TGF- β and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. *Inflammation* 2012; 35:138-42.
- Banfi C, Auwerx J, Poma F, Tremoli E, Mussoni L. Induction of plasminogen activator inhibitor I by the PPAR α ligand, WY-14,643, is dependent on ERK1/2 signaling pathway. *Thromb Haemost* 2003; 90:611-9.
- Bari M, Tedesco M, Battista N, Pasquariello N, Pucci M, Gasperi V, Scaldaferrì ML, Farini D, De Felici M, Maccarrone M. Characterization of the endocannabinoid system in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20:139-47.
- Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116:590-7.
- Bellocchio L, Cervino C, Vicennati V, Pasquali R, Pagotto U. Cannabinoid type 1 receptor: another arrow in the adipocytes bow. *J Neuroendocrinol* 2008; 20:130-8.
- Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci* 2012; 6:1-7.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997; 277:1094-7.
- Beltramo M, Piomelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylethanolamide. *Neuroreport* 2000; 11:1231-5.
- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclançon A, Maffrand JP, Lefur G, Oury-Donat F, Soubrié P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases ACP30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003; 63:908-14.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonylethanolamide cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 1998; 353:23-31.
- Benson N, Metelkin E, Demin O, Li GL, Nichols D, van der Graaf GH. A Systems Pharmacology Perspective on the Clinical Development of Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitors for Pain. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 2014; 3: e91.
- Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 1992; 107:544-52.
- Bhattacharya D, Czechowicz A, Ooi AG, Rossi DJ, Bryder D, Weissmann IL. Niche recycling through division-independent egress of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2009; 206:2837-50.
- Bifulco M, Laezza C, Valenti M, Ligresti A, Portella G, Di Marzo V. A new strategy to block tumor growth by inhibiting endocannabinoid inactivation. *FASEB J* 2004; 18:1606-8.

- Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J Neurochem* 1999; 72:2113-9.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MY, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V. N-acyldopamines: novel synthetic CB₁ cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J* 2000; 351:817-24.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 2001; 268:1982-9.
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81:224-38.
- Bobrov MY, Shevchenko VP, Yudushkin IA, Rogov SI, Remov MN, Fomina-Ageeva EV, Gretskaya NM, Nagaev IY, Kuklev DV, Bezuglov VV. Hydrolysis of anandamide and eicosapentanoic acid ethanolamide in mouse splenocytes. *Biochemistry* 2000; 65:615-9.
- Bojesen IN, Hansen HS. Binding of anandamide to bovine serum albumin. *J Lipid Res* 2003; 44:1790-4.
- Bojesen IN, Hansen HS. Membrane transport of anandamide through resealed human red blood cell membranes. *J Lipid Res* 2005; 46:1652-9.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁. *Biochem J* 1995; 312:637-41.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. Signaling pathway associated with stimulation of CB₂ peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 1996; 237:704-11.
- Bouaboula M, Hilairt S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol* 2005; 517:174-81.
- Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In: Elsohly M (ed.). *Marijuana and the Cannabinoids*. Humana Press: Totowa, NY, 2007; pp. 17-49.
- Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002; 197:492-509.
- Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152:567-75.
- Burns KA, Heuvel V. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771: 952-60.
- Carayon P, Marchand J, Dussossoy D, Derocq JM, Jbilo O, Bord A, Bouaboula M, Galiègue S, Mondière P, Pénarier G, Fur GL, Defrance T, Casellas P. Modulation and functional involvement of CB₂ peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation. *Blood* 1998; 92:3605-15.
- Chen JK, Chen J, Imig JD, Wei S, Hachey DL, Guthi JS, Falck JR, Capdevila JH, Harris RC. Identification of novel endogenous cytochrome p450 arachidonate metabolites with high affinity for cannabinoid receptors. *J Biol Chem* 2008; 283:24514-24.
- Chen Y, Willcockson HH, Valtchanoff JG. Vanilloid receptor TRPV1-mediated phosphorylation of ERK in murine adjuvant arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17:244-51.
- Chen L, Tredget EE, Liu C, Wu Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS One* 2009; 4:e7119.
- Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J. Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem* 2012; 287:34660-82.
- Choi HJ, Kim JM, Kwon E, Che JH, Lee JI, Cho SR, Kang SK, Ra JC, Kang BC. Establishment of efficacy and safety assessment of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSCs) in a nude rat femoral segmental defect model. *J Korean Med Sci* 2011; 26:482-91.

- Coulon D, Faure L, Salmon M, Wattolet V, Bessoule JJ. Occurrence, biosynthesis and functions of N-acylphosphatidylethanolamines (NAPE): not just precursors of N-acylethanolamines (NAE). *Biochimie* 2012; 94:75-85.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996; 384:83-7.
- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9371-6.
- De Lago E, Petrosino S, Valenti M, Morera E, Ortega-Gutierrez S, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V. Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. *Biochem Pharmacol* 2005; 70:446-52.
- Day TA, Rakhshan F, Deutsch DG, Barker EL. Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide. *Mol Pharmacol* 2001; 59:1369-75.
- De Petrocellis L, Starowicz K, Moriello AS, Vivese M, Orlando P, Di Marzo V. Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8): effect of cAMP, cannabinoid CB₁ receptors and endovanilloids. *Exp Cell Res* 2007; 313:1911-20.
- De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini PC, Orlando P, Di Marzo V. Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325:1007-15.
- Desernaud F, Cadas H, Piomelli D. Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J Biol Chem* 1995; 270:6030-5.
- Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 1993; 44:791-6.
- Deutsch DG, Glaser ST, Howell JM, Kunz JS, Puffenbarger RA, Hillard CJ, Abumrad N. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J Biol Chem* 2001; 276:6967-73.
- Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66:201-10.
- Devane WA, Dysarz III FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34:605-13.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee PG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258:1946-9.
- Diaz-Alonso J, Aguado T, Wu CS, Palazuelos J, Hofmann C, Garcez P, Guillemot F, Lu HC, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I. The CB₁ cannabinoid receptor drives corticospinal motor neuron differentiation through the Ctip2/Satb2 transcriptional regulation axis. *J Neurosci* 2012; 32:16651-65.
- Di Marzo V, Fontana A, Cades H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Plomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994; 372:686-91.
- Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J* 1998; 331:15-9.
- Di Marzo V, Deutsch DG. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 1998; 5:386-404.
- Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:438-55.
- Di Marzo V, Cristino L. Why endocannabinoids are not all alike. *Nat Neurosci* 2008; 11:124-6.
- Dinh TP, Kathuria S, Piomelli D. RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol* 2004; 66:1260-4.

- Di Pasquale E, Chahinian H, Sanchez P, Fantini J. The insertion and transport of anandamide in synthetic lipid membranes are both cholesterol-dependent. *PLoS One* 2009; 4:e4989.
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 1992; 68:879-87.
- ElSohy MA. Chemical constituents of cannabis. In: Grotenhermen F, Russo E (eds) *Cannabis and Cannabinoids Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*. Harworth Press, New York, pp. 27-36.
- Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005; 54:2838-43.
- Everaerts W, Nilius B, Owsianik G. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2010; 103:2-17.
- Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D. Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:8756-61.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995; 48:443-50.
- Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 2002; 87:305-12.
- Fioravanti B, De Felice M, Stucky CL, Medler KA, Luo MC, Gardell LR, Ibrahim M, Malan TP Jr, Yamamura HI, Ossipov MH, King T, Lai J, Porreca F, Vanderah TW. Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists. *J Neurosci* 2008; 28:11593-602.
- Fowler CJ, Ghafouri N. Does the hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol regulate its cellular uptake? *Pharmacol Res* 2008; 58:72-6.
- Fowler CJ. Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33:181-5.
- Fowler CJ. Transport of endocannabinoids across the plasma membrane and within the cell. *FEBS J* 2013; 280:1895-904.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63:1256-72.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature* 2003; 425:90-3.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guizarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci* 2011; 15:64-9.
- Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, Nakamaru K, Nakamaru Y. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res* 49; 429-37.
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Bouboula M, Shirez D, Le Fur G, Casellas D, Carriker D, Camyon P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232:54-61.
- Galve-Roperh I, Chiurchiù V, Diaz-Alonso J, Bari M, Guzman M, Maccarrone M. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Prog Lip Res* 2013; 52:633-50.
- Gardner OS, Dewar BJ, Earp HS, Samet JM, Graves LM. Dependence of peroxisome proliferator-activated receptor ligand-induced mitogen-activated protein kinase signaling on epidermal growth factor

- receptor transactivation. *J Biol Chem* 2003; 278:46261-9.
- Gasperi V, Fezza F, Pasquariello N, Bari M, Oddi S, Agro AF, Maccarrone M. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:219-29.
- Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86:1646-7.
- Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006; 98:251-86.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4269-74.
- Goncalves MB, Suetterlin P, Yip P, Molina-Holgado F, Walker DJ, Oudin MJ, Zentar MP, Pollard S, Yáñez-Muñoz RJ, Williams G, Walsh FS, Pangalos MN, Doherty P. A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in age-dependent manner. *Mol Cell Neurosci* 2008; 38:526-36.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 2006; 1071:10-23.
- Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry* 1966; 5:467-77.
- Graham ES, Angel CE, Schwarcz LE, Dunbar PT, Glass M. Detailed characterization of CB2 receptor protein expression in peripheral blood immune cells from healthy volunteers using flow cytometry. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23:25-34.
- Grant I, Cahn BR. Cannabinoids and endocannabinoid modulators: Therapeutic promises and challenges. *Clinic Neurosci Res* 2005; 5:185-99.
- Guettier C. Which stem cells for adult liver? *Ann Pathol*, 2005; 25:33-44.
- Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem* 2004; 279:27849-54.
- Habayeb OM, Taylor AH, Bell SC, Taylor DJ, Konje JC. Expression of the endocannabinoid system in human first trimester placenta and its role in trophoblast proliferation. *Endocrinology* 2008; 149:5052-60.
- Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989; 106:619-33.
- Hansen HS, Diep TA. N-acylethanolamines, anandamide and food intake. *Biochem Pharmacol* 2009; 78:553-60.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:3662-5.
- Harkany T, Gutman M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28:83-92.
- Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano Moriello A, Lutz B, Di Marzo V. Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:607-16.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahian A, Campbell WB. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 1997; 69:631-8.
- Huang J, Zhang Z, Guo J, Ni A, Deb A, Zhang L, Mirotso M, Pratt RE, Dzau VJ. Genetic modification of viability, migration, engraftment and capillary density in the injured myocardium. *Circ Res* 2012; 106:1753-62.
- Hong SB, Li CM, Rhee HJ, Park JH, He X, Levy B. Molecular cloning and characterization of a human cDNA and gene encoding a novel acid ceramidase-like protein. *Genomics* 1999; 62:232-41.
- Hornung D, Waite LL, Ricke EA, Bentzien F, Wallwiener D, Taylor RN. Nuclear peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma have opposing effects on

- monocyte chemotaxis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3108-14.
- Howlett AC. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:607-34.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:161-202.
- Howlett AC. Cannabinoid Receptor Signaling. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168:53-79.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6155-60.
- Idris AI, Van't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med* 2005; 11:774-9.
- Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Canals M, Milligan G, Baker D, Van't Hof RJ, Ralston SH. Cannabinoid Receptor Type 1 Protects against Age-Related Osteoporosis by Regulating Osteoblast and Adipocyte Differentiation in Marrow Stromal Cells. *Cell Metab* 2009; 10:139-47.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347:645-50.
- Ivanov I, Borchert P, Hinz B. A simple method for simultaneous determination of N-arachidonylethanolamine, N-oleylethanolamine, Npalmitoylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol in human cells. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407:1781-7.
- Jacobsson SO; Wallin T; Fowler CJ. Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:951-9.
- Jacobsson SO, Fowler CJ. Characterization of palmitoylethanolamide transport in mouse Neuro-2a neuroblastoma and rat RBL-2H3 basophilic leukemia cells: comparison with anandamide. *Br J Pharmacol* 2001; 132:1743-54.
- Jarrahian A, Manna S, Edgemond WS, Campbell WB, Hillard CJ. Structure-activity relationships among N-arachidonylethanolamine (anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J Neurochem* 2000; 74:2597-606.
- Jerosch J, Bader A, Uhr G. Knochen: curasan Taschenatlas spezial 2002; 1-168.
- Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, Avraham HK. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS One* 2007; 2:e641.
- Jorda MA, Verbakel SE, Valk PJM, Vankan-Berkhoudt YV, Maccarrone M, Finazzi-Agro A, Löwenberg B, Delwel R. Haematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood* 2002; 99:2786-93.
- Justinova Z, Panlilio LV, Moreno-Sanz G, Redhi GH, Auber A, Secci ME, Mascia P, Bandiera T, Armirotti A, Bertorelli R, Chefer SI, Barnes C, Yasar S, Piomelli D, Goldberg SR. Effects of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitors in Non-Human Primate Models of Nicotine Reward and Relapse. *Neuropsychopharmacology* 2015; 40: 2185-97.
- Kaczocha M, Hermann A, Glaser ST, Bojesen IN, Deutsch DG. Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J Biol Chem*. 2006; 281:9066-75.
- Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:6375-80.
- Kaczocha M, Glaser ST, Chae J, Brown DA, Deutsch DG. Lipid droplets are novel sites of N-acylethanolamine inactivation by fatty acid amide hydrolase-2. *J Biol Chem*. 2010; 285: 2796-806.
- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of

bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121:823-35.

Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedmann H. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225:1-8.

Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedmann H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 2003; 74:486-96.

Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7355-9.

Köllmer M, Buhrman JS, Zhang Y, Gemeinhart RA. Markers Are Shared Between Adipogenic and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *J Dev Biol Tissue Eng* 2013; 5:18-25.

Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem* 2002; 277:23278-86.

Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF. Inactivation of N-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* 2006; 45:4720-6.

Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005; 85:1373-416.

Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:73-9.

Ligresti A, Morera E, Van Der Stelt M, Monory K, Lutz B, Ortar G, Di Marzo V. Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J* 2004; 380:265-72.

Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived

stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol* 2010; 25:807-15.

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:13345-50.

Lombard C, Hedge VL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Perinatal exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol triggers profound defects in T cell differentiation and function in fetal and postnatal stages of life, including decreased responsiveness to HIV antigens. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 339:607-17.

Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. Springer 2012; 1-1208.

LoVerme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 2005; 67:15-9.

LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattaco-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319:1051-61.

Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G, Finazzi-Agro A. Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem* 2000; 267:2991-7.

Maccarone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, Finazzi-Agrò A. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem* 2003; 278:33896-903.

Maccarone M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A. Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3. *J Biol Chem* 2003; 278:13318-24.

Maccarrone M, Bari M, Di Rienzo M, Finazzi-Agro A, Rossi A. Progesterone activates fatty acid amide hydrolase (FAAH) promoter in human T lymphocytes through the transcription factor Ikaros Evidence for

- a synergistic effect of leptin. *J Biol Chem* 2003; 278:32726-32.
- Maccarrone M, De Felici M, Klinger FG, Battista N, Fezza F, Dainese E, Siracusa G, Finazzi-Agrò A. Mouse blastocysts release a lipid which activates anandamide hydrolase in intact uterus. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:215-21.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 1995; 15:6552-61.
- Mackie K. Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168:299-325.
- Makara JK, Mor M, Fegley D, Szabo SI, Kathuria S, Astarita G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Rivara S, Freund TF, Piomelli D. Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat Neurosci* 2005 ; 8:1139-41.
- Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during *in vitro* osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994; 158:555-72.
- Marrs WR, Blankman JL, Horne EA, Thomazeau A, Lin YH, Coy J, Bodor AL, Muccioli GG, Hu SS, Woodruff G, Fung S, Lafourcade M, Alexander JP, Long JZ, Li W, Xu C, Möller T, Mackie K, Manzoni OJ, Cravatt BF, Stella N. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci* 2010; 13:951-7.
- Messeguer A, Planells-Cases R, Ferrer-Montiel A. Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor. *Curr Neuropharmacol* 2006; 4:1-15.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3171-80.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346:561-4.
- Matsuda S, Kanemitsu N, Nakamura A, Mimura Y, Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S. Metabolism of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, in porcine ocular tissues. *Exp Eye Res* 1997; 64:707-11.
- Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn Mem* 2009; 16:332-7.
- McKemy DD. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 2005; 1:16.
- McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:411-32.
- Mechoulam R, Gaoni Y. Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschr Chem Org Naturist* 1967, 25:175-213.
- Mechoulam R. The pharmacohistory of Cannabis sativa. In: *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, ed. Mechoulam R., Boca Raton, FL: CRC Press 1986; pp. 1-19.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:83-90.
- Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, Ross SA, Khan IA, ElSohly MA. Potency trends of delta(9)-THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *J Forensic Sci* 2010; 55:1209-17.
- Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:1364-9.
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK,

- Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58:726-41.
- Mor M, Rivara S, Lodola A, Plazzi PV, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Piersanti G, Kathuria S, Piomelli, D. Cyclohexylcarbamate 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors. Synthesis, quantitative structureactivity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem* 2004; 47:4998-5008.
- Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen ED, Ge K, Roeder RG, Spiegelman BM. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem* 2002; 277:41925-30.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365:61-5.
- Natarajan V, Schmid PC, Reddy PV, Schmid HHO. Catabolism of N-acylethanolamine phospholipids by dog brain preparations. *J Neurochem* 1984; 42:1613-9.
- Naylor K, Eastell R. Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8:379-89.
- Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, De Simone C, Rapino C, Dainese E, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:840-50.
- Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, Rapino C, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem Biol* 2009; 16:624-32.
- Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A, Bab I. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:696-701.
- Oka S, Yanagimoto S, Ikeda S, Gokoh M, Kishimoto S, Waku K, Ishima Y, Sugiura T. Evidence for the involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonylglycerol in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation in mouse ear. *J Biol Chem* 2005; 280:18488-97.
- Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N. Biosynthetic Pathways of the Endocannabinoid Anandamide. *Chem & Biodiv* 2007; 4:1842-57.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:10344-9.
- Ortega-Gutiérrez S, Hawkins EG, Viso A, López-Rodríguez ML, Cravatt BF. Comparison of anandamide transport in FAAH wild-type and knockout neurons: evidence for contributions by both FAAH and the CB1 receptor to anandamide uptake. *Biochem* 2004; 43:8184-90.
- O'Sullivan SE, Bennett AJ, Kendall DA, Randall MD. Cannabinoids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *Proc Intl Cannabinoid Res Soc* 2006, (abstract).
- O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152:576-82.
- Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science* 1945; 102:400-1.
- Owsianik G, D'hoedt D, Voets T, Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2006; 156:61-90.
- Pagano C, Pilon C, Calcagno A, Urbanet R, Rossato M, Milan G, Bianchi K, Rizzuto R, Bernante P, Federspil G, Vettor R. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4810-9.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzman M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J* 2006; 20:2405-7.
- Palazuelos J, Ortega Z, Diaz-Alonso J, Guzman M, Galve-Roperh I. CB2 cannabinoid receptors promote neural

- progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling. *J Biol Chem* 2012; 287:1198-209.
- Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res* 2009; 60:85-92.
- Paradisi A, Pasquariello N, Barcaroli D, Maccarrone M. Anandamid regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor dependent manner. *J Biol Chem* 2008; 283:6005-12.
- Paria BC, Dey SK. Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem Phys Lipids* 2000; 108:211-20.
- Pate DW. Anandamide structure-activity relationships and mechanisms of action on intraocular pressure in the normotensive rabbit model. Doctoral dissertation. Kuopio University Publications 1999, Kuopio.
- Patel S, Carner EJ, Ho WSV, Rademacher DJ, Cunningham S, Reddy DS, Falck JR, Cravatt BF, Hillard CJ. The postmortal accumulation of brain N-arachidonylethanolamine (anandamide) is dependent upon fatty acid amide hydrolase activity. *J Lipid Res* 2005; 46:342-9.
- Patinkin D, Milman G, Breuer A, Fride E, Mechoulam R. Endocannabinoids as positive or negative factors in hematopoietic cell migration and differentiation. *Eur J Pharmacol* 2008; 595:1-6.
- Pertwee RG. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol Ther* 1988; 36:189-261.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 2010; 62:588-610.
- Pertwee RG. Elevating endocannabinoid levels: pharmacological strategies and potential therapeutic applications. *Proc Nutr Soc* 2014; 73: 96-105.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. Structural determinants of recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 5802-7.
- Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Mor M, Compton TR, Dasse O, Monaghan EP, Parrott JA Putman D. Pharmacological Profile of the Selective FAAH Inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews* 2006; 1:21-38.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Limoneti DW, Carig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301:1020-4.
- Puffenbarger RA, Kapulina O, Howell JM, Deutsch DG. Characterization of the 5'-sequence of the mouse fatty acid amide hydrolase. *Neurosci Lett* 2001; 314:21-4.
- Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 2008; 28:6231-8.
- Ramer R, Hinz B. Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100:59-69.
- Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2007; 4:1-11.
- Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol* 2006; 70:101-11.
- Romano MR, Lograno MD. Involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha in vascular response of endocannabinoids in the bovine

- ophthalmic artery. *Eur J Pharmacol* 2012; 683:197-203.
- Rotman N, Wahli. PPAR Modulation of Kinase-Linked Receptor Signaling in Physiology and Disease. *Physiology* 2010; 25:176-85.
- Saghatelian A, Trauger SA, Want EJ, Hawkins EG, Siuzdak G, Cravatt BF. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochem* 2004; 43:14332-9.
- Savinainen JR, Saario SM, Laitinen JT. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol* 2012; 204(2):267-76.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HHQ, George SR, O'Dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol Brain Res* 1999; 64:193-8.
- Schmid HHO, Schmid PC, Natarajan V. N-Acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res* 1990; 29:1-43.
- Schmuhl E, Ramer R, Salamon A, Peters K, Hinz B. Increase of mesenchymal stem cell migration by cannabidiol via activation of p42/44 MAPK. *Biochem Pharmacol* 2014; 87:489-501.
- Scutt A, Williamson EM. Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors. *Calcif Tissue Int* 2007; 80:50-9.
- Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology* 1996; 137:4499-502.
- Shinohara N, Uyama T, Jin XH, Tsuboi K, Tonai T, Houchi H, Ueda N. Enzymological analysis of tumor suppressor A-C1 reveals a novel group of phospholipid-metabolizing enzymes. *J Lipid Res* 2011; 52:1927-35.
- Shoji T, Ii M, Mifune Y, Matsumoto T, Kawamoto A, Kwon SM, Kuroda T, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2010; 90:637-49.
- Simon GM, Cravatt BF. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 2006; 281:26465-72.
- Simon GM, Cravatt BF. Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem* 2008; 283:9341-9.
- Song ZH, Zhong M. CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294:204-9.
- Sophocleous A, Landao-Bassonga E, Van't Hof RJ, Idris AI, Ralston SH. The type 2 cannabinoid receptor regulates bone mass and ovariectomy-induced bone loss by affecting osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* 2011; 152:2141-9.
- Starowicz K, Nigram S, Di Marzo V. Biochemistry and pharmacology of endocannabinoids. *Pharmacol Ther* 2007; 114:13-33.
- Stephen J, Delvecchio C, Spitale N, Giesler A, Radford K, Bilan P, Cox PG, Capone JP, Nair P. PPAR ligands decrease human airway smooth muscle cell migration and extracellular matrix synthesis. *Eur Respir J* 2013; 41:425-32.
- Sugawara K, Biro T, Tsuruta D, Toth BI, Kromminga A, Zakany N. Endocannabinoids limit excessive mast cell maturation and activation in human skin. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:726-38.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:89-97.
- Suigura T, Yoshinaga N, Waku K. Rapid generation of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, in rat brain after decapitation. *Neurosci Lett* 2001; 297:175-8.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog in Lipid Res* 2006; 45:405-46.

- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J* 2004; 380:749-56.
- Sun X, Dey SK. Aspects of endocannabinoid signaling in periimplantation biology. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 149:5052-60.
- Sun X, Xie H, Yang J, Wang H, Bradshaw HB, Dey SK. Endocannabinoid signaling directs differentiation of trophoblast cell lineages and placentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:16887-92.
- Sun Y, Alexander SPH, Kendall DA, Bennett AJ. Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:1095-7.
- Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* 2007; 152:734-43.
- Szabo B. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Biotrend Reviews* 2008; 2:1-13.
- Takeda S. Central control of bone remodelling. *J Neuroendocrinol* 2008; 20:802-7.
- Tam J, Ofek O, Fride E, Ledent C, Gabet Y, Müller R, Zimmer A, Mackie K, Mechoulam R, Shohami E, Bab I. Involvement of Neuronal Cannabinoid Receptor CB1 in Regulation of Bone Mass and Bone Remodeling. *Mol Pharmacol* 2006; 70:786-92.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32:11-6.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-7.
- Thors L, Fowler CJ. Is there a temperature-dependant uptake of anandamide into cells? *Br J Pharmacol* 2006; 149:73-81.
- Todorov I, Nair I, Ferreri K, Rawson J, Kuroda A, Pascual M, Omori K, Valiente L, Orr C, Al-Abdullah I, Riggs A, Kandeel F, Mullen Y. Multipotent progenitor cells isolated from adult human pancreatic tissue. *Transplant Proc* 2005; 37:3420-1.
- Tsuboi K, Sun YX, Okamoto Y, Araki N, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J Biol Chem* 2005; 280:11082-92.
- Tsuboi K, Takezaki N, Ueda N. The N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Chem Biodivers* 2007; 4:1914-25.
- Tsuboi K, Okamoto Y, Ikematsu N, Inoue M, Shimizu Y, Uyama T, Wang J, Deutsch DG, Burns MP, Ulloa NM, Tokumura A, Ueda N. Enzymatic formation of N-acylethanolamines from N-acylethanolamine plasmalogen through N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and -independent pathways. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1811:565-77.
- Tuch BE. Stem cells – a clinical update. *Australian Family Physician* 2006; 35:719-21.
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 2004; 303:359-63.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids Inhibit N- and P/Q-Type Calcium Channels in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *J Neurophysiol* 1997; 78:43-50.
- Tzavara ET; Moutsimilli L; Bisogno T; Di Marzo V; Phebus LA; Nomikos GG; Giros B. Endocannabinoids activate transient receptor potential vanilloid 1 receptors to reduce hyperdopaminergia-related hyperactivity: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 2006; 59: 508-15.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem* 1995; 270:14332-9.
- Uyama T, Ikematsu N, Inoue M, Shinohara N, Jin XH, Tsuboi K, Tonai T, Tokumura A, Ueda N. Generation of N-acylphosphatidylethanolamine by members of the phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT) family. *J Biol Chem* 2012; 287:31905-19.

- Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, Mayen A, Löwenberg B, Delwel R. Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for haematopoietic cells. *Blood* 1997; 90:1448-57.
- Vanden Heuvel JP. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr* 1999; 129:575S-80S.
- Vanden Heuvel JP, Kreder D, Belda B, Hannon DB, Nugent CA, Burns KA, Taylor MJ. Comprehensive analysis of gene expression in rat and human hepatoma cells exposed to the peroxisome proliferator WY14,643. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 188:185-98.
- Vandevoorde S. Overview of the chemical families of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2008; 8:247-67.
- Venketachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007; 76:387-417.
- Wager-Miller J, Westenbroek R, Mackie K. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids* 2002; 121:83-9.
- Waleh NS, Cravatt BF, Apte-Deshpande A, Terao A, Kilduff TS. Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene. *Gene* 2002; 291:204-10.
- Walker JL, Zhai N, Zhang L, Bleaken BM, Wolff I, Gerhart J, Weinstein MG, Menko AS. Unique precursors for the mesenchymal cells involved in injury response and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:13730-5.
- Wang J, Paria BC, Dey SK, Armant DR. Stage-specific excitation of cannabinoid receptor exhibits differential effects on mouse embryonic development. *Biol Reprod* 1999; 60:839-44.
- Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK. Aberrant cannabinoid signaling impair oviductal transport of embryos. *Nat Med* 2004; 10:1074-80.
- Wang H, Dey SK. Lipid signalling in embryo implantation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; 77:84-102.
- Wang H, Dey SK, Maccarrone M. Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev* 2006; 27:427-48.
- Watanabe K, Ogi H, Nakamura S, Kayano Y, Matsunaga T, Yoshimura H, Yamamoto I. Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. *Life Sci* 1998; 62:1223-39.
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 2003; 24:434-8.
- Watts C, McConkey H, Anderson L, Caldwell M. Anatomical perspectives on adult neural stem cells. *Journal of Anatomy* 2005; 207:197-208.
- Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem* 2006; 281:3659-78.
- Werner CM, Schirmer SH, Gensch C, Pavlickova V, Pöss J, Wright MB, Böhm M, Laufs U. The dual PPAR α/γ agonist aleglitazar increases the number and function of endothelial progenitor cells: implications for vascular function and atherogenesis. *Br J Pharmacol* 2014; 171:2685-703.
- Wilkinson JD, Williamson EM. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism of psoriasis. *J Dermatol Sci* 2007; 45:87-92.
- Wisnoskey BJ, Sinkins WG, Schilling WP. Activation of vanilloid receptor type 1 in the endoplasmic reticulum fails to activate store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem J* 2003; 372:517-28.
- Xu X, Otsuki M, Sumitani S, Saito H, Kouhara H, Kasayama S. RU486 antagonizes the inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor α on interleukin-6 production in vascular endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 81:141-6.
- Yang H, Wang Z, Capó-Aponte JE, Zhang F, Pan Z, Reinach PS. Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal

epithelial cells. *Exp Eye Res* 2010; 91:462-71.

Yao W, Guan M, Jia J, Dai W, Lay YA, Amugongo, Liu R, Olivos D, Saunders M, Lam KS, Nolta J, Olvera D, Ritchie RO, Lane NE. Reversing bone loss by directing mesenchymal stem cells to the bone. *Stem Cells* 2013; 31:2003-14.

You T, Disanzo BL, Wang X, Yang R, Gong D. Adipose tissue endocannabinoid system gene expression: depot differences and effects of diet and exercise. *Lipids in Health and Disease* 2011, 10:194.

Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, Nuttall AL. Vanilloid receptors in hearing: altered cochlear sensitivity by vanilloids and expression of TRPV1 in the organ of corti. *J Neurophysiol* 2003; 90:444-55.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999; 400:452-7.

Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BA, Blomgren A, Birnir B, Bevan S, Eschaliere A, Mallet C, Gomis A, Högestätt ED. Monoacylglycerols activate TRPV1 - a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One* 2013; 8:e8161.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des Endocannabinoidsystems	2
Abb. 2	Strukturformeln von AEA, OEA und PEA als Vertreter der NAEs	4
Abb. 3	Strukturformel von 2-AG.	5
Abb. 4	Schematische Darstellung der Arbeitsweise der FAAH	12
Abb. 5	Exemplarische Darstellung der CD34+-Trennung in 100- und 200-facher Vergrößerung	45
Abb. 6	Exemplarischer Kulturverlauf von ADSCs eines Donors in Passage 1 bis 3 (P1-3) in 100- und 200-facher Vergrößerung	46
Abb. 7	Scratch-Assay zur Untersuchung des promigratorischen Effekts von URB597 und AA-5HT	47
Abb. 8	Zeitabhängiger Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Migration von ADSCs	48
Abb. 9	Konzentrationsabhängiger Einfluss von URB597 und AA-5HT auf die Migration von ADSCs	49
Abb. 10	Kinetik der URB597-bedingten Aktivierung der p42/44 MAPK	51
Abb. 11	Kinetik der AA-5HT-bedingten Aktivierung der p42/44 MAPK	51
Abb. 12	Konzentrationsabhängiger Einfluss von URB597 auf die p42/44 MAPK-Aktivierung	52
Abb. 13	Konzentrationsabhängiger Einfluss von AA-5HT auf die p42/44 MAPK-Aktivierung	53
Abb. 14	Rolle der p42/44 MAPK bei der URB597- bzw. AA-5HT-bedingten Migration von ADSCs	54
Abb. 15	LC-MS-Analyse des intrazellulären Gehalts an Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen nach FAAH Inhibierung	56
Abb. 16	Scratch-Assay zum Nachweis einer promigratorischen Wirkung von Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen	58
Abb. 17	Konzentrationsabhängiger promigratorischer Effekt von Endocannabinoiden auf ADSCs	59

Abb. 18	Konzentrationsabhängiger promigratorischer Effekt von Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen auf ADSCs	60
Abb. 19	Konzentrationsabhängige Aktivierung der p42/44 MAPK bedingt durch Endocannabinoide	62
Abb. 20	Konzentrationsabhängige Aktivierung der p42/44 MAPK bedingt durch Endocannabinoid-ähnliche Substanzen	63
Abb. 21	Einfluss des PPAR α -Inhibitors GW6471 auf die URB597- bzw. AA-5HT-bedingte Migration	65
Abb. 22	Rolle von GW6471 bei der Migration bedingt durch Endocannabinoide bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen	66
Abb. 23	Konzentrationsabhängiger promigratorischer Effekt von WY14643 auf ADSCs	67
Abb. 24	Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle der p42/44 MAPK bei der URB597-bedingten Aktivierung von PPAR α	69
Abb. 25	Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle der p42/44 MAPK bei der AA-5HT-bedingten Aktivierung von PPAR α	70
Abb. 26	Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle der p42/44 MAPK bei der AEA-bedingten Aktivierung von PPAR α .	72
Abb. 27	Mikroskopische Untersuchungen zur Rolle von p42/44 bei der 2-AG-bedingten Aktivierung von PPAR α .	73
Abb. 28	Mikroskopische Untersuchung zur Rolle der p42/44 MAPK bei der Aktivierung von PPAR α bedingt durch Endocannabinoid-ähnliche Substanzen	74
Abb. 29	Einfluss des PPAR α -Antagonisten GW6471 auf die p42/44-MAPK- Aktivierung bedingt durch FAAH-Inhibitoren.	76
Abb. 30	Einfluss von PPAR α auf die p42/44-MAPK-Aktivierung bedingt durch Endocannabinoide bzw. Endocannabinoid-ähnliche Substanzen	77
Abb. 31	Einfluss von GW6471 auf das basale Level der p42/44-MAPK-Aktivierung.	77
Abb. 32	Einfluss von URB597 bzw. AA-5HT auf die alkalische Phosphatase	79
Abb. 33	Einfluss von URB597 bzw. AA-5HT auf die Mineralisierung	80

Abb. 34	Grafische Darstellung der Ergebnisse	88
Tabelle 1	Liste der verwendeten Geräte	17
Tabelle 2	Liste der benutzten Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3	Liste der verwendeten Programme	18
Tabelle 4	Übersicht der verwendeten Zellkonzentrationen/cm ² sowie verwendete Kulturvolumina für die experimentelle Zellaussaat entsprechend der Zellkulturfläche	23
Tabelle 5	Übersicht über die im Kralewski-Puffer verwendeten Inhibitoren und deren Effekt	35
Tabelle 6	Übersicht des Standards zur Proteinbestimmung mit BCA Kit	37
Tabelle 7	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die SDS Gelelektrophorese bei einem Ansatz von 8 Gelen	39
Tabelle 8	Analyse der zellulären Viabilität von ADSCs behandelt mit den FAAH-Inhibitoren URB597 und AA-5HT	50
Tabelle 9	Rolle von CB1, CB2 und TRPV1 bei der URB597- bzw. AA-5HT-bedingten Migration	55
Tabelle 10	Analyse der zellulären Viabilität von ADSCs behandelt mit Endocannabinoiden und Endocannabinoid-ähnlichen Substanzen	61
Tabelle 11	Rolle von CB1, CB2 und TRPV1 bei der Endocannabinoid-bedingten Migration	64
Tabelle 12	Einfluss von PD98059, GW6471 und WY14643 auf die PPAR α -Aktivierung in ADSC-Kernen	75